

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

MALADIE HYPEROSTOSIQUE
RECHERCHE D'UN MÉCANISME PHYSIOPATHOLOGIQUE

par

Jean-François Perron

Département de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.)

Août 1993



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

Bibliothèque nationale
du Canada

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-315-93048-9

Canada

TABLE DES MATIERES

- Liste des illustrations.....vi
- Liste des abréviations.....viii
- Résumé.....x
- 1. INTRODUCTION.....11
 - 1.1 La maladie hyperostotique.....11
 - 1.1.1 Définition.....11
 - 1.1.2 Historique.....12
 - 1.2 Calcification.....12
 - 1.2.1 Nucléation du phosphate de calcium.....12
 - 1.2.2 Composition des vésicules matricielles...14
 - 1.2.2.1 Phospholipides.....14
 - 1.2.2.2 Protéines et enzymes.....15
 - 1.2.2.3 Biogénèse des vésicules matricielles.....16
 - 1.3 Minéralisation.....17
 - 1.3.1 Métabolisme des phosphates.....17
 - 1.3.2 Implication possible des mitochondries...19
 - 1.3.3 Rôle des phospholipides acides.....20
 - 1.3.4 Les deux étapes de la minéralisation.....21
 - 1.4 Vitamine A et hyperostose.....23
 - 1.4.1 Métabolisme du rétinol.....23
 - 1.4.1.1 Sources et absorption du rétinol..23
 - 1.4.1.2 Transport: stockage et libération du rétinol.....24

1.4.1.3	Rôles principaux de la vitamine A.	25
1.4.1.4	Concentration normale et hyperostotique.....	26
1.4.2	Action nucléaire de l'acide rétinoïque et des rétinoïdes.....	27
1.4.2.1	Actions générales.....	27
1.4.2.2	Induction de l'activité phosphatase alcaline.....	29
1.4.3	Effets positifs des rétinoïdes en clinique.....	30
1.4.4	Références cliniques de la toxicité de l'étrétinate et de l'isotrétinoïne.....	31
1.4.5	Induction d'hyperostose en laboratoire...	32
1.5	But de la présente étude.....	33
2.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	35
2.1	Cultures cellulaires.....	35
2.1.1	Prélèvement de tissus et mise en culture.	35
2.1.2	Multiplification et traitements des cellules.....	36
2.1.3	Isolation des vésicules matricielles.....	37
2.2	Mesure de l'activité phosphatase alcaline.....	37
2.3	Mesure de l'activité pyrophosphatasique.....	38
2.4	Estimation par ELISA de la présence de phosphatase alcaline.....	40
2.5	Mesure du contenu en ADN.....	41
2.6	Microscopie électronique.....	42
2.6.1	Étude de la calcification.....	42
2.6.2	Fixation des échantillons biologiques....	42
2.7	Extraction et purification de la "retinol binding protein".....	43
2.7.1	Colonne de DEAE-cellulose.....	43

2.7.2	Filtration sur gel.....	44
2.7.3	Colonne d'affinité TTR-Sépharose.....	44
2.7.4	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	44
2.7.5	Coloration à l'argent pour l'estimation de la pureté de la "retinol binding protein".....	46
3.	RÉSULTATS.....	47
3.1	Influence de l'acide rétinoïque sur les activités phosphatasiques de fibroblastes <i>in vitro</i>	47
3.1.1	Effet de l'acide rétinoïque sur l'activité phosphatase alcaline fibroblastique du ligament patellaire de lapin.....	47
3.1.2	Effet de l'acide rétinoïque sur l'activité phosphatase alcaline fibroblastique du ligament patellaire et du ligament longitudinal antérieur humain.....	50
3.1.3	Effet de l'acide rétinoïque sur l'activité pyrophosphatase fibroblas- tique du ligament patellaire de lapin....	54
3.2	Estimation de la variation par l'acide rétinoïque du contenu cellulaire en phosphatase alcaline.....	54
3.2.1	Variation par l'acide rétinoïque du contenu cellulaire de la phosphatase alcaline des fibroblastes du ligament patellaire de lapin.....	54
3.2.2	Variation par l'AR de la concentration cellulaire de PA des fibroblastes du LP humain.....	56
3.2.3	Localisation externe de la phosphatase alcaline des vésicules matricielles.....	56
3.3.	Observations microscopiques de la calcification des vésicules matricielles.....	59
3.4	Purification du "retinol binding protein" humain.....	59

4.	DISCUSSION.....	64
5.	CONCLUSION.....	73
6.	BIBLIOGRAPHIE.....	75
7.	REMERCIEMENTS.....	99
8.	ANNEXE I.....	101

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figures:

- Figure 1: Effect de concentrations croissantes d'acide
rétinoïque sur l'activité phosphatase alcaline
des fibroblastes.....48
- Figure 2: Activité phosphatase alcaline des fibroblastes
de lapin en fonction du temps de traitement à
l'acide rétinoïque.....49
- Figure 3: Activité phosphatase alcaline des vésicules
matricielles de fibroblastes de lapin en
fonction du temps de traitement à l'acide
rétinoïque.....51
- Figure 4: Activité phosphatase alcaline de fibroblastes
humains axiaux et périphériques52
- Figure 5: Activité phosphatase alcaline de vésicules
matricielles de fibroblastes humains axiaux
et périphériques.....53

Figure 6:	Activité pyrophosphatasique de fibroblastes de lapin.....	55
Figure 7:	Effet de l'acide rétinoïque sur le contenu cellulaire de la phosphatase alcaline de fibroblastes de lapin et des vésicules en fonction du temps d'incubation.....	57
Figure 8:	Effet de l'acide rétinoïque sur le contenu en phosphatase alcaline de fibroblastes humains et de leurs vésicules matricielles.....	58
Figure 9:	Localisation externe de la phosphatase alcaline sur les vésicules matricielles.....	59
Figure 10:	Purification du "retinol binding protein" par filtration sur gel.....	62
Figure 11:	Purification du "retinol binding protein" par chromatographie d'affinité.....	63

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide déoxyribonucléique
AMP	Adénosine monophosphate
APS	Persulfate d'ammonium
AR	Acide rétinoïque
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	Adénosine triphosphatase
B/L/K	"bone/liver/kidney"
BSA	Albumine bovine sérique
CLAP	Chymostatine/Leupeptine/Antipain/Pepstatine
cpm	Comptes par minute
CRBP	Protéine liante du calcium cellulaire
DEAE	Diéthylaminoéthyle
DISH	"Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis"
DMEM	"Dulbecco modified Eagle's medium"
DMSO	Diméthyl-sulfoxyde
EDTA	Éthylène diamino tétraacétate disodique
EGF	Facteur de croissance épidermique
EGTA	Acide di(amino-2éthoxy)-1,2 éthane- NNN'N' tétraacétique
ELISA	"Enzyme-linked immunosorbent assay"
FBS	Sérum de veau foetal
HBSS	"Hank's balance salts solution"
IgG	Immunoglobuline de classe G
kDa	Kilodalton

LLA	Ligament longitudinal antérieur
LP	Ligament patellaire
mARN	Acide ribonucléique messager
MH	Maladie hyperostotique
NP-40	Nonidet P-40 (détergent)
OCP	Octacalcium phosphate
PA	Phosphatase alcaline
PBS	Saline tamponnée avec du phosphate
PCA	Acide perchloroacétique
Pi	Phosphate inorganique
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfoxyde
PPase	Pyrophosphatase inorganique
PPi	Pyrophosphate inorganique
PS	Phosphatidyl-sérine
RAR	Récepteur nucléaire de l'acide rétinoïque
RBP	Protéine liante du rétinol
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
T-20	Tween-20 (détergent)
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthylènediamine
TES (tampon)	acide 2-[[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxy- méthyl)éthyl]-amino]éthanesulfonique
TTR	Transthyrétine (pré-albumine)
VM	Vésicule matricielle

RÉSUMÉ

Maladie Hyperostotique
Recherche d'un mécanisme physiopathologique
par

Jean-François Perron

Département de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
de l'université de Sherbrooke en vue de l'obtention du grade
de maître ès sciences (M.Sc.)

La maladie hyperostotique est caractérisée par une nouvelle calcification et ossification originant des sites d'attache des ligaments à l'os (enthèse). Elle est associée à un dysmétabolisme de la vitamine A et elle est plus fréquente au niveau du ligament axial. Des traitements avec des analogues naturels et synthétiques de la vitamine A chez l'homme et chez les animaux peuvent induire des calcifications et ossifications similaires. Le processus de calcification commence généralement dans des vésicules matricielles riches en phosphatase alcaline (PA). Par conséquent, nous avons étudié l'influence de l'acide tout-trans rétinolique (RA) sur le niveau et l'activité de la phosphatase alcaline de fibroblastes et des vésicules extracellulaires qu'ils libèrent. Les fibroblastes sont isolés de ligaments patellaires humains et de lapin et du ligament longitudinal antérieur humain foetal. Les vésicules, isolées par centrifugations successives à 30000g et 75000g, mesurent 100nm de diamètre selon une estimation par microscopie électronique à balayage. L'activité et le niveau de PA sont estimés par l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphate et par ELISA, respectivement. La pyrophosphatase inorganique (PPase), une des plus importantes phosphatases, hydrolyse le pyrophosphate inorganique qui inhibe la transformation du phosphate de calcium amorphe en hydroxyapatite microcristalline. L'activité de la PPase est mesurée par l'incubation des cellules en culture avec du $[^{32}\text{P}]$ PPI et la précipitation du $[^{32}\text{P}]$ phosphate en phosphomolybdate. L'acide rétinolique 3ng/ml a augmenté l'activité et le niveau de PA des fibroblastes et vésicules de lapin mais uniquement le niveau de PA de fibroblastes humains foetaux. L'activité PA du ligament axial des vésicules matricielles (VM) et des fibroblastes humains foetaux s'est montrée 7 fois supérieure à l'activité périphérique. L'activité PPase des fibroblastes patellaires de lapin augmente avec l'addition d'AR et de PPI ou d'ATP. Une étude préliminaire de calcification des vésicules enrichies en PA a montré la formation d'une matière cristalline ressemblant à de l'hydroxyapatite. Nous avons purifié le RBP, la protéine liante du rétinol, qui pourra nous servir dans des études ultérieures. En résumé, nous avons mis au point un modèle de formation de vésicules matricielles *in vitro* par traitement de fibroblastes avec une concentration physiologique d'acide rétinolique observée chez les patients hyperostotiques.

1. INTRODUCTION

1.1 La maladie hyperostotique

1.1.1 Définition

La maladie hyperostotique (MH) est aussi connue sous le nom d'hyperostose vertébrale ankylosante ou de maladie de Forestier en français, et de DISH "Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis" en anglais. La MH consiste essentiellement en une néoformation osseuse originant des sites d'insertion de ligaments et de tendons (enthèses) du squelette axial et périphérique.

L'anatomie pathologique de la MH est mal connue car elle n'a été étudiée que sur du matériel d'autopsie concernant des lésions anciennes très évoluées et sur de rares biopsies, permettant mal d'étudier les premiers stades de la maladie.

On peut observer les mêmes types de lésions hyperostotiques chez l'homme et chez tous les mammifères terrestres ou marins (LAGIER, 1979).

1.1.2 Historique

C'est en 1950 que FORESTIER et ROTES-QUEROL décrivaient pour la première fois l'hyperostose chez l'homme.

Une hyperostose d'origine alimentaire a été ensuite décrite chez le chat sous le nom d'ostéopériostite diffuse déformante, en Uruguay (CHRISTI et al., 1957) et de spondylose cervicale déformante, en Australie (ENGLISH et al., 1964). Ces deux groupes ont observé une ostéopathie provoquant des anomalies de la posture et de la démarche qui se manifestent radiologiquement par des exostoses de la colonne vertébrale et par des ostéophytes périarticulaires au niveau des membres. Cette ostéopathie survenait chez le chat adulte nourri exclusivement ou principalement au foie de boeuf cru, entraînant une intoxication chronique par la vitamine A (SEAWRIGHT et al., 1967).

1.2 Calcification

1.2.1 Nucléation du phosphate de calcium

Il y a deux théories expliquant l'induction de la minéralisation de novo durant la calcification. La première veut que la minéralisation soit initiée par une nucléation hétérogène sur le collagène seul (GLIMCHER, 1959) ou sur le

collagène en combinaison avec des protéines différentes telles l' α 2-HS-glycoprotéine, le polypeptide Gla de l'os et l'ostéocalcine (TERMINE, 1981). Selon la deuxième théorie, la minéralisation est un processus médié par la cellule et impliquant soit des mitochondries (BRIGHTON et HUNT., 1976 et 1978; SHAPIRO et LEE, 1975), soit des vésicules matricielles (VM) (ANDERSON, 1969; ANDERSON, 1976; BAB et al., 1979). ANDERSON (1969) et BONUCCI (1970) ont observé les premiers cristaux minéraux dans des vésicules d'environ 200nm de diamètre qui étaient concentrées à l'extrémité du front de calcification de la plaque de croissance du cartilage épiphysaire durant l'ossification endochondrale. Des vésicules calcifiantes ont aussi été observées dans les sites initiaux de minéralisation de l'os (ASCENZI et BONUCCI, 1971; BERNARD et PEASE, 1969) et dans la prédentine des dents (BERNARD, 1972; EISENMAN et GLICK, 1972 ; OZAWA et NAJIMA, 1972; SISCA et PROVENZA, 1972; SLAVKIN et al., 1972).

Des études utilisant des techniques anhydres de préparation, en microscopie électronique, ont confirmé que les vésicules matricielles sont bien le premier site de calcification dans le cartilage, les os et la dentine (AKISAKA et SHIGENAGA, 1983; AKISAKA et al., 1986; ALI, 1977; ALI et al., 1978; BARCKHAUS et al., 1981; GAY et al., 1978; HUNTZIKER et al., 1981; OZAWA et YAMAMOTO, 1983).

La spectroscopie infrarouge a permis d'observer la présence de calcium et de phosphate sous une forme non-cristalline, sans mettre en évidence du phosphate de calcium amorphe dans des vésicules matricielles naissantes de chondrocytes de dinde incubées dans de la "lymphe" artificielle de cartilage i.e. un milieu liquide de composition similaire à la lymphe (WUTHIER, 1977). Cependant le calcium et le phosphate sont associés aux protéines et aux lipides des VM. La première phase minérale détectable est soit l'hydroxyapatite (HAP) $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, soit l'octacalcium phosphate (OCP) $[\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_5.5\text{H}_2\text{O}]$ qui est hydrolysé en hydroxyapatite. L'hydroxyapatite partiellement carbonatée constitue la masse minérale de l'os et du cartilage (WUTHIER et al., 1978). Ce phosphate de calcium est le plus stable et le moins soluble dans les conditions physiologiques.

1.2.2. Composition des vésicules matricielles

1.2.2.1 Phospholipides

Les vésicules matricielles sont riches en lipides, avec une composition voisine de celle de la membrane cellulaire dont elles dérivent. Elles sont enrichies en phosphatidylsérine, en sphingomyéline, en lysophospholipides, en glycosphingolipides et en cholestérol libre, mais dépourvues de phosphatidylcholine (WUTHIER, 1975). La phosphatidylsérine, localisée sur la face interne de la membrane des

vésicules, a la propriété de lier sélectivement le calcium (MAJESKA et al., 1979). Plus de la moitié de la phosphatidyl-sérine (PS) y est présente sous forme de complexes lipides-phosphate-calcium (WUTHIER et GORE, 1977).

1.2.2.2 Protéines et enzymes

Identifier et attribuer une fonction aux protéines des vésicules matricielles est un défi de taille; il en résulte donc peu d'études à ce niveau. L'actine se retrouve chez les VM d'os alvéolaires du rat (MUHLRAD et al., 1982) mais n'est pas présente dans les VM de cartilage de volaille (BOYAN-SALYERS et al., 1978). Dans le but de montrer la présence de protéines liantes du calcium, GENGE et al. (1988) ont découvert que la calpacine II, capable de se lier au calcium en présence de phospholipides, constitue une des protéines majeures des VM.

Les vésicules matricielles isolées présentent des activités phosphatasiques de type phosphatase alcaline (PA) (ALI et al, 1970; ANDERSON et al., 1970; MATSUZAWA et ANDERSON, 1971), l'activité pyrophosphatase inorganique (PPase) de la PA (ALI et al., 1970), adénosine triphosphatase (AKISAKA et GAY, 1985) et nucléotide triphosphate pyrophosphohydrolase (HSU, 1983). Trois phosphatases alcalines sont identifiées à ce jour: la forme placentaire, la forme intestinale et la forme "liver-bone-

kidney" (MOSS, 1986). Elles sont ancrées vers l'extérieur de la membrane cellulaire par un lien phosphatidylinositol-glycane. REGISTER et al. (1986) ont montré un rôle direct de la phosphatase alcaline dans la minéralisation en observant une diminution de la minéralisation de VM du cartilage épiphysaire de poulets traités à la phospholipase C qui clive l'ancre reliant la phosphatase à la membrane cellulaire. Encore aujourd'hui le rôle précis de la phosphatase alcaline n'est pas élucidé.

1.2.2.3 Biogénèse des vésicules matricielles

Il est possible de considérer quatre mécanismes de formation des vésicules matricielles: le bourgeonnement de pseudopodes de la membrane cytoplasmique, l'extrusion d'une structure préformée à l'intérieur de la cellule, la formation à partir des fragments de cellules désintégrées et l'assemblage extracellulaire de sous-unités sécrétées par la cellule.

Plusieurs évidences appuient l'hypothèse du bourgeonnement: les études morphologiques de calcification endochondrale (ANDERSON, 1969; BONUCCI, 1967 et 1970), les activités enzymatiques semblables (présence de phosphatase alcaline et d'adénosine triphosphatase sur la membrane des chondrocytes et des vésicules (ANDERSON et al., 1970;

MATSUZAWA et ANDERSON, 1971; ALI et al., 1970) et la composition lipidique analogue (WUTHIER, 1975).

1.3 Minéralisation

1.3.1 Métabolisme des phosphates

La phosphatase alcaline et la pyrophosphatase inorganique (PPase) jouent un rôle important dans la minéralisation normale de l'os et du cartilage. Les inhibiteurs de la phosphatase alcaline tels le lévamisole et les diphosphonates inhibent la calcification de vésicules matricielles de la plaque de croissance du cartilage du rat rachitique (ANDERSON et HSU, 1978; ANDERSON et SAJDERA, 1976; ANDERSON et al., 1975; FALLON et al., 1980). De plus, la courbe d'inactivation par la chaleur de l'activité pyrophosphatase isolée de vésicules matricielles se superpose parfaitement à la courbe d'inhibition par la chaleur de la calcification de la plaque de croissance (ANDERSON, 1969).

L'absence de substrats de phosphatases tels que l'AMP et le β -glycérophosphate dans le milieu physiologique empêche la calcification des coupes de plaque de croissance (ANDERSON et HSU, 1978) ainsi que la calcification des vésicules matricielles (ALI et EVANS, 1977; HSU et ANDERSON, 1977; MURPHREE et al., 1982). La phosphatase alcaline en solution n'est pas capable d'initier la déposition du

$^{45}\text{CaPO}_4$ (HSU et al., 1978) mais lorsqu'on l'incorpore dans des vésicules reconstituées, un dépôt de calcium se forme (HSU et ANDERSON, 1978; HSU et al., 1978; KANABE et al., 1983). Des études cytochimiques ont montré que les activités phosphatase alcaline, Ca-ATPase et pyrophosphatase résident principalement dans la membrane des VM et dans la membrane plasmique des chondrocytes, des ostéoblastes du périoste et des odontoblastes, d'où dérivent apparemment les VM (AKISAKA et GAY, 1985 et 1986; ANDERSON et al., 1970; BERNARD, 1978; KANABE et al., 1983; MORRIS et al., 1986; OZAWA et NAJIMA, 1972; TAKANO et al., 1986).

Le pyrophosphate inorganique (PPi) est produit dans une variété de mécanismes biochimiques qui conduisent à la synthèse de divers constituants cellulaires (protéines, lipides, phospholipides, nucléotides, acides nucléiques, polysaccharides structuraux, glycogène, etc...). Des pyrophosphatases inorganiques (PPase) hydrolysent le PPi en phosphate inorganique, une action qui est essentielle à la calcification car le PPi inhibe la cristallisation de l'hydroxyapatite. Ces enzymes à activité PPase incluent la glucose-6-phosphatase, la phosphatase alcaline et d'autres pyrophosphatases plus spécifiques (CASWELL et al., 1983). Hsu (1992) a démontré que l'ATP, et non l'AMP, à une concentration physiologique (1mM ATP) permet la déposition de calcium par les vésicules matricielles provenant du cartilage de rats rachitiques alors que, malgré son action

favorisant la calcification, l'ATP est un inhibiteur puissant de la précipitation spontanée du phosphate de calcium en absence de vésicules matricielles.

1.3.2 Implication des mitochondries

Il est connu depuis longtemps que les mitochondries isolées ont la capacité d'accumuler le calcium et le phosphate par des mécanismes puissants de translocation. Cependant, les mitochondries de tissus mous non-calcifiables ne contiennent pas de dépôts de phosphate de calcium parce que la membrane cellulaire limite l'entrée du calcium grâce à la pompe Ca-ATPase membranaire (PENNISTON et al., 1980). De ce fait, la concentration cytosolique en calcium est maintenue entre 10^{-7} et 10^{-6} M (CARAFOLI, 1981), un niveau où les mitochondries accumulent peu de calcium. Cependant, lorsque le niveau de calcium extracellulaire augmente, il y a une élévation de la quantité de Ca^{2+} qui diffuse dans la cellule. Une grande partie de ce calcium sera expulsé par la pompe Ca-ATPase alors qu'une faible partie sera entreposée sous forme de phosphate de calcium dans les mitochondries, ce qui peut causer avec le temps une calcification métastatique intracellulaire. Une calcification dystrophique analogue peut résulter d'un bris de la membrane par un agent toxique, d'une ischémie ou d'un traumatisme entraînant une baisse de l'efficacité de la pompe Ca-ATPase. Donc, lors d'une calcification dystrophique ou métastatique, la minéralisation

intracellulaire débute dans les mitochondries. Une diminution du calcium emmagasiné dans les mitochondries survient au moment de l'élaboration des VM et de l'induction de la calcification extracellulaire (BRIGHTON et HUNT, 1976), ce qui montre que le calcium est impliqué dans la formation des vésicules matricielles.

Le calcium est aussi un inducteur de la production de VM dans les érythrocytes (ALLAN et THOMAS, 1981) et dans la membrane de la bordure en brosse des cellules de la muqueuse intestinale (BUGESS et PRUM, 1982; HIROKAWA et al., 1982).

1.3.3. Rôle des phospholipides acides

Les vésicules matricielles isolées sont fortement enrichies en phospholipides acides du type phosphatidyl-sérine (PS). Ces phospholipides peuvent servir de trappes à calcium passives durant la minéralisation. WUTHIER et GORE (1977) ont observé la présence de complexes calcium-phospholipides-phosphate dans les vésicules matricielles. Des complexes lipidiques extraits de sites de calcification sont parfaitement capables d'initier la déposition de phosphate de calcium entraînant la formation d'hydroxyapatite in vitro à une concentration physiologique de calcium et de phosphate. Donc théoriquement, la phosphatase alcaline ne semble pas nécessaire pour déclencher la minéralisation puisque les complexes

calcifiables calcium-phospholipide-phosphate sont présents sur la membrane. Il est cependant très probable que ces complexes ne se forment qu'après la première phase de minéralisation qui favorise l'augmentation de la concentration en phosphate et la perte des PPI inhibiteurs de la nucléation de l'hydroxyapatite, d'où l'importance des enzymes telles que la phosphatase alcaline et la pyrophosphatase inorganique (Anderson, 1988).

1.3.4. Les deux étapes de la minéralisation

Dans toutes les formes de calcification squelettique, la minéralisation se réalise en deux phases: la phase de formation durant laquelle les cristaux initiaux d'hydroxyapatite se forment à l'intérieur, puis à la surface des vésicules matricielles et la phase de propagation où les premiers cristaux formés servent de germes pour la nucléation de nouveaux cristaux.

La première phase est une étape active contrôlée par la membrane des vésicules qui renferme des phospholipides acides et une activité phosphatasique. Les phospholipides acides sont la force motrice première pour la capture de calcium par la vésicule matricielle. La capture du phosphate et du calcium est dépendante des ions zinc. Quand la vésicule matricielle est libérée dans le milieu extracellulaire, il se passe une période brève durant

laquelle le calcium s'accumule davantage que le phosphate. Ensuite, pendant une phase plus lente, le calcium déplace le zinc d'un site critique, entraînant la capture rapide de phosphate et de calcium, favorisée par la formation de complexes PS-Ca-Pi-calpacine ou avec d'autres protéines liantes du calcium (WUTHIER, 1988).

La deuxième phase est une étape physico-chimique. La vitesse de formation des nouveaux cristaux dépend de la concentration en ions calcium et phosphate du liquide extracellulaire, de la présence d'une matrice de collagène qui favorise le dépôt de minéraux et de la présence de pyrophosphate qui inhibe la cristallisation de l'apatite (ANDERSON, 1988). La nucléation de l'octacalcium phosphate (OCP) ou de l'apatite se produit dans la vésicule matricielle à l'interface entre la bicouche lipidique riche en PS et les complexes lipides-Ca-Pi-protéine. La croissance des microcristaux suit la surface lipidique riche en PS. Le calcium et le phosphate continuent de s'accumuler lentement par la force du gradient créé par la nucléation et l'OCP se transforme en HAP (WUTHIER, 1988).

Le tendon d'Achille de la dinde a été très souvent utilisé comme modèle pour l'étude de la relation spatiale et temporelle de la déposition minérale dans les vésicules matricielles et dans le collagène. La séquence de minéralisation commence par la déposition d'apatite dans les

vésicules et ensuite dans les fibres de collagène (ARSENAULT et al., 1991).

1.4 Vitamine A et hyperostose

1.4.1 Métabolisme du rétinol

1.4.1.1 Sources et absorption du rétinol

La vitamine A se trouve dans la diète sous forme de précurseurs d'origine végétale, les carotènes, et sous forme d'esters de rétinyle, principalement le palmitate de rétinol, d'origine animale.

Les carotènes sont absorbés passivement au niveau des entérocytes où ils sont transformés en rétinol par une dioxygénase et réduits à la forme rétinol par une réductase (HOLLANDER et RUBLE, 1978).

Les esters de rétinyle sont hydrolysés en rétinol par la cholestéryle estérase dans le lumen intestinal. Le passage du rétinol à travers des cellules intestinales est facilité par une protéine liante du rétinol, le CRBP II "Cellular Retinol Binding Protein II" qui est apparentée à la CRBP retrouvée dans plusieurs autres types de cellules.

1.4.1.2 Transport, stockage et libération du rétinol

Chez le rat et chez l'homme, plus de 80% du rétinol quitte l'intestin sous forme d'esters, principalement le palmitate et le stéarate de rétinyle, incorporés dans des chylomicrons, pour se rendre au foie pour l'entreposage.

Au moment de la libération hépatique du rétinol dans la circulation sanguine, les esters de rétinol sont hydrolysés en rétinol qui s'associe au RBP "Retinol Binding Protein" ou bien protéine liante du rétinol en français, une protéine de 21.2 kDa synthétisée par le foie. Le complexe bimoléculaire holo-RBP est stabilisé par association avec la transthyrétine (TTR), une préalbumine de 55 kDa. De par sa taille, ce complexe trimoléculaire protège le RBP et le rétinol de l'excrétion rénale.

Le complexe trimoléculaire peut se lier à un site spécifique de la surface d'une cellule-cible et libérer sa molécule de rétinol (SILVAPRASADARAO et FINDLAY, 1988a et b). Le rétinol est alors transféré à une protéine vectrice intracellulaire de la famille des CRBP. Le RBP libre (apo-RBP) a une affinité faible pour la TTR et est filtré par le glomérule et catabolisé dans le tissu rénal.

1.4.1.3 Rôles principaux de la vitamine A

La vitamine A (rétinol) est requise pour la croissance et la différenciation des tissus épithéliaux, pour la croissance des os, pour la reproduction ainsi que pour le développement embryonnaire. Son rôle est essentiel dans le fonctionnement de la rétine où le rétinol est métabolisé en 11-cis rétinol qui, par combinaison avec l'opsine, forme la rhodopsine.

Le rétinol et certains caroténoïdes réduisent les conséquences de certaines maladies infectieuses et empêchent le développement de certaines tumeurs. L'acide rétinoïque est un métabolite très actif de la vitamine A. Il est actif dans la croissance, dans la différenciation et dans la transformation cellulaire mais ne corrige pas les désordres reproductifs de la spermatogénèse et les désordres de la vision d'animaux déficients en rétinol.

L'acide rétinoïque (AR) est le premier "morphogène" connu. En effet, un gradient de concentration d'acide rétinoïque est l'élément qui détermine chez le poulet l'orientation du développement de l'aile (THALLER et EICHELE, 1987; SLACK, 1987). Cependant certaines évidences (WANEK et al. 1991., NOJI et al. 1991., BROCKES, 1991) démontrent que l'AR ne serait pas un morphogène. Une source locale d'AR aurait un effet polarisant sur les tissus

environnants déterminant ensuite l'axe antéropostérieur sans l'intervention d'un gradient d'AR.

L'acide tout-trans rétinoïque topique démontre une activité de relachement des cellules du follicule pileux. Cet effet kératolytique sur la desquamation anormale est probablement l'élément responsable du traitement de l'acné par l'acide tout-trans rétinoïque. Depuis 1955, l'acide 13-cis rétinoïque est un médicament de choix dans le traitement de l'acné récalcitrante. La prise per os d'acide 13-cis rétinoïque entraîne une diminution de la production de sébum et une diminution subséquente de l'inflammation (BOYD, 1989).

1.4.1.4 Concentration normale et hyperostotique

La recherche d'une anomalie du métabolisme de la vitamine A dans la MH est basée sur les observations d'hyperostose induite par une hypervitaminose A, tant chez l'homme que chez l'animal. Dans une première étude effectuée à Toulouse, ARLET et al. (1983) ont mis en évidence une augmentation significative du rétinol plasmatique chez des patients atteints de MH (0.60 ± 0.20 mg/l chez 51 cas de MH et 0.51 ± 0.23 mg/l chez 41 témoins, $p < 0.05$). Une deuxième étude réalisée à Sherbrooke (ABITEBOUL et al., 1985) a confirmé l'augmentation du

rétinol plasmatique dans la MH : 0.69 ± 0.14 mg/l chez 17 témoins et $0.82 \pm .21$ chez 23 cas de MH.

Chez l'homme et le rat, il semble que la toxicité du rétinol se manifeste lorsque le rapport molaire rétinol/RBP est voisin ou légèrement supérieur à 1. Il semble donc que que le rétinol libre soit toxique.

Conjointement à l'augmentation du rétinol sérique, il y a aussi augmentation de la concentration sérique d'AR tout-trans et 13-cis chez les patients hyperostotiques (PÉRIQUET et al., 1991).

1.4.2 Action nucléaire de l'acide rétinoïque et des rétinoïdes

1.4.2.1 Actions générales

Les rétinoïdes peuvent influencer l'expression des récepteurs de certaines hormones et facteurs de croissance. Par exemple, l'acide rétinoïque augmente la synthèse des récepteurs de l'EGF "Epidermal Growth Factor" ou facteur de croissance épidermique de cellules pulmonaires foetales et la synthèse des récepteurs de l'interleukine-2 de thymocytes activés (OBERG et al., 1988; SIDELL et RAMSDELL, 1988; THOMSON et ROSNER, 1989). D'une façon inverse, l'acide rétinoïque diminue la densité des récepteurs de la vitamine

1 α ,25-dihydroxy D3 de cellules de calotte crânienne foetale et néonatale (PETKOVICH et al., 1987b).

L'acide rétinoïque et les rétinoïdes influencent surtout l'expression de gènes en se liant à une région spécifique des récepteurs nucléaires "retinoic acid receptors" ou RAR (GIGUERE et al., 1987; PETKOVICH et al 1987a). Cette liaison active le récepteur en un facteur capable de réguler la transcription. Lorsque l'AR est lié à son récepteur RAR, le complexe activé peut alors réguler la transcription au niveau du promoteur sur la séquence RARE (élément de réponse d'acide rétinoïque "retinoic acid response element"). Deux classes de récepteurs de rétinoïdes ont été identifiées chez les vertébrés. Il y a la famille des récepteurs de l'AR, les RAR, et la famille des récepteurs du rétinoïde X, les RXR. Il y a trois gènes RAR chez l'homme, RAR- α (PETKOVICH et al., 1987a), RAR- β (BRAND et al., 1988) et RAR- γ (KRUST et al., 1989). Il y a aussi trois gènes RXR chez l'homme, RXR- α , RXR- β et RXR- γ (MANGELSDORF et al., 1990; MANGELSDORF et EVANS, 1992; YU et al., 1991; ROWE et al., 1992; LEID et al., 1992). Ces deux familles de récepteurs ont une affinité environ mille fois plus petite pour le rétinol. Les récepteurs de l'acide rétinoïque et des rétinoïdes appartiennent à la grande famille incluant les récepteurs des stéroïdes, les récepteurs des hormones thyroïdiennes et le récepteur du calcitrol (EVANS, 1988). Ces protéines partagent un domaine

de liaison à l'ADN conservé et un mécanisme d'action commun par lequel la liaison du ligand facilite la liaison du récepteur avec l'ADN et/ou la régulation de la transcription par le complexe ligand-récepteur. Aucun récepteur comparable n'a été mis en évidence pour le rétinol. Il est donc possible que, pour produire certaines de ses actions, le rétinol doive être oxydé en acide rétinoïque dans les cellules-cibles.

1.4.2.2 Induction de l'activité phosphatase alcaline

Une concentration physiologique d'acide rétinoïque induit in vitro l'activité de la phosphatase alcaline (PA) de l'épithélium de transition de la vessie de rat (REESE et POLITANO, 1981) et des neutrophiles humains (SATO et al., 1985), de la prostate de rat qui contient surtout de la phosphatase acide (REESE et POLITANO, 1981), de la calotte crânienne de rats nouveaux-nés (NG et al., 1988 et 1989; RODAN et al., 1990) ou de la souris (NAKAYAMA et al., 1990), des cellules endothéliales aortiques bovines (ADAMS et MELNYKOVYCH, 1985; ADAMS et al., 1986) et des kératinocytes humains (COPE et WILLE, 1989). Les rétinoïdes peuvent moduler l'activité de la phosphatase alcaline par une action directe ou par synergie avec d'autres agents administrés conjointement. Nous n'avons pas encore de preuve définitive du rôle de régulateur de l'acide rétinoïque sur l'activité de la phosphatase alcaline dans ces tissus, mais

l'importance de l'acide rétinoïque dans la différenciation cellulaire (SPORN et al., 1984) suggère qu'il intervient dans la régulation de cet enzyme de surface (REESE et al., 1992). De plus, GIANNI et al. (1991) ont démontré que l'acide rétinoïque augmente la transcription du gène de la phosphatase alcaline (B/L/K) plutôt que la demi-vie de son mARN dans des cellules de tératocarcinome F9.

1.4.3 Effets positifs des rétinoïdes en clinique

L'acide rétinoïque peut agir à différents stades de la cancérogénèse. Il agit comme suppresseur de l'expression du phénotype malin initié dans les cellules par le cancérogène (MERRIMAN et BERTRAME, 1979). L'acide rétinoïque tout-trans a été testé avec succès dans certaines affections du tissu conjonctif telles que les chéloïdes et les cicatrices hypertrophiques (DAILY et NESTON, 1986) et l'acide 13-cis rétinoïque améliore la mobilité articulaire (BALMER et ZAUM, 1985). Les rétinoïdes constituent un progrès majeur de la thérapeutique dermatologique et ont transformé le traitement des troubles de la kératinisation et de l'acné. Ils offrent aussi de grandes perspectives dans le traitement et la prévention de certains cancers cutanés, bronchiques et cervico-utérins.

Cependant, les manifestations d'hypervitaminose A qui surviennent souvent aux doses efficaces limitent les applications.

1.4.4 Références cliniques de la toxicité de l'étrétinate et de l'isotrétinoïne

Les rétinoïdes de synthèse sont de plus en plus utilisés en dermatologie et en oncologie. Deux rétinoïdes très utilisés sont l'étrétinate (tigason), un analogue synthétique de l'acide tout-trans rétinoïque, et l'isotrétinoïne (roaccuttane) ou l'acide 13-cis rétinoïque. Mis à part les effets cutanéomuqueux, hépatiques, lipidiques ou tératogéniques des rétinoïdes, on mentionne un nombre croissant d'hyperostose axiale et/ou périphérique dans la littérature.

SILLEVIS et al. (1984) ont observé un épaississement des corticales du radius et une ossification au niveau de l'insertion de la membrane inter-osseuse de l'avant-bras chez une jeune fille de 19 ans traitée à l'étrétinate pendant plus de 5 ans, pour une érythrodermie ichtyosique. BENNET et al. (1985) décrivent une hyperostose dorso-lombaire due à 6 mois de traitement à l'étrétinate pour une kératodermie palmoplantaire, chez un homme de 52 ans. BURGE et RYAN (1985) rapportent une hyperostose axiale, une ossification des ligaments ilio-lombaires et des insertions

tendineuses du bassin ainsi que de l'extrémité du fémur chez un patient traité à l'étrétinate pour une ichtyose. L'étude de DI GIOVANNA et al. (1986) porte sur 38 patients d'un âge moyen de 44 ans avec différents troubles de la peau traités à l'étrétinate pendant une moyenne de 60 mois. Trente-deux patients développèrent des proliférations osseuses, essentiellement périphériques, ce qui suggère que certains rétinoïdes pourraient avoir une action plus ou moins spécifique, axiale ou périphérique. De nombreux autres cas d'hyperostose induits par l'étrétinate sont décrits par CÉRIO et al. (1987), PAPASAVAS et al. (1987), MELNICK et al. (1987), HANS et al. (1988) et MARTIN et al. (1989). PITTSLEY et YODER (1983) rapportent le cas de remaniements osseux d'allure hyperostosique chez 4 des 9 patients d'un âge moyen de 28.7 ans traités par l'acide 13-cis rétinoïque pour une ichtyose. Des résultats semblables ont été observés par PENNES et al. (1984 et 1988) et ELLIS et al. (1985).

1.4.5 Induction d'hyperostose en laboratoire

Cette maladie a été reproduite expérimentalement chez le chat par une nourriture riche en foie ou additionnée de vitamine A. Une dose de vitamine A de 30mg/Kg/jour, soit environ 100 000 UI/Kg/jour, suffit pour produire des lésions osseuses en 24 semaines (SEAWRIGHT et al., 1967). Ces

lésions osseuses ne sont pas liées à une ostéodystrophie due à un déséquilibre Ca/P (CLARK et al., 1970).

Un modèle d'hyperostose chez le rat a été développé dans le laboratoire du Dr André Lussier au centre hospitalier universitaire de Sherbrooke (LUSSIER et al 1989). Des rats Lewis adultes ont reçu une alimentation enrichie en vitamine A, soit 200 000 UI/Kg/jour pendant 4 ½ mois ou 100 000 UI/Kg/jour pendant 6 mois, l'unité internationale pour la vitamine A étant l'équivalent de 0.3 µg de rétinol. L'examen histologique a mis en évidence une ossification significative des vertèbres lombaires, thoraciques et cervicales et une calcification du ligament longitudinal antérieur. Les radiographies ont mis en évidence des lésions axiales et périphériques.

1.5 But de la présente étude

Il existe de nombreuses maladies où la calcification pathologique provoque des problèmes importants comme la tendinite calcifiante, le "Milwaukee shoulder syndrome", des formes d'arthrose, les plaques d'athérosclérose, la calcification diffuse pulmonaire et rénale, l'hypercalcémie associée à une tumeur maligne et la tympanosclérose (ANDERSON, 1988). Les études récentes sur le mécanisme de formation de ces calcifications pathologiques indiquent un

même processus impliquant des vésicules matricielles (VM) dérivant de membranes cellulaires (ANDERSON, 1988).

Considérant la présence d'une concentration plasmatique significativement plus élevée en rétinol et en acide rétinoïque chez les patients hyperostotiques, nous avons voulu étudier l'effet des rétinoïdes sur l'activité de la phosphatase alcaline impliquée dans le métabolisme des phosphates, sur la présence de VM et sur la formation de phosphate de calcium. Dans ce but, nous avons utilisé des cultures de cellules fibroblastiques prélevées sur le ligament patellaire et sur le ligament longitudinal antérieur de lapins et d'humains. Ces cellules en culture ont été traitées avec des doses d'acide rétinoïque voisines du taux sérique de patients hyperostotiques.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Cultures cellulaires

2.1.1 Prélèvement de tissus et mise en culture

Les tissus utilisés proviennent du lapin adulte ou d'un foetus humain de 19 semaines provenant de la clinique d'avortement du CHUS. Le ligament longitudinal antérieur est prélevé le long de la colonne vertébrale avec des microciseaux et des pinces à bout fin. Les ligaments patellaires sont prélevés avec un scalpel en prenant soin d'éliminer le plus possible la partie tendineuse extérieure.

Les fragments de ligament sont d'abord stérilisés par quatre lavages de 5 minutes dans des vases de Pétris stériles contenant le milieu de culture DMEM "Dulbecco's Modified Eagle medium", de la fongizone 2.5 µg/ml et de la gentamycine 0.8mg/ml, dans une hotte à flot laminaire. Ensuite, ils sont transférés dans un cinquième vase de Pétris où ils sont réduits en fins morceaux taillés à l'aide de deux scalpels stériles. Les morceaux sont lavés dans un tamis stérile avec du PBS "Phosphate buffered saline" stérile et incubés à 37°C dans un tube à bouchon hermétique pendant une période de une à trois heures en présence de collagénase type P 1.5mg/ml dans du DMEM sans sérum, pour séparer les cellules. Après une centrifugation de 10

minutes à 500g (centrifugeuse IEC centra-8R), les cellules du culot sont resuspendues dans 20ml de DMEM contenant 10% de FBS décomplémenté et incubées à 37°C et 5% CO₂ jusqu'à confluence. Avant la confluence, le milieu de culture est remplacé tous les 4 jours.

2.1.2 Multiplication et traitements des cellules

Les passages des cellules confluentes s'effectuent à l'aide d'une solution contenant 0.25% de trypsine et 0.2g d'EDTA par litre de PBS à pH 7.3. Les cellules en suspension sont lavées par centrifugation dans du DMEM pour être remises dans deux flacons de culture. Au quatrième passage, les cellules, environ 60 millions, sont congelées avec un abaissement de température de 1°C par minute jusqu'à -80°C dans un milieu de congélation (DMEM + 20% FBS + 12.5% DMSO) afin d'empêcher la formation de cristaux de glace.

Avant les différents essais, les cellules sont décongelées et remises en culture pour 4 autres passages afin d'obtenir 20 flacons de 3 millions de cellules. Au moment des essais, les cellules ont subi moins de 10 passages.

Les traitements avec l'acide rétinoïque sont effectués sous la hotte à flot laminaire dans l'obscurité. L'acide rétinoïque est dissout dans du DMSO et la

concentration en DMSO ne dépasse jamais 0.015% dans le milieu de culture.

Les traitements sont répétés chaque jour durant toute l'expérience pour chaque groupe. Les surnageants qui contiennent des vésicules matricielles sont gardés à 4°C et réunis chaque jour et traités par du CLAP 1/1000 (Chymostatine, leupeptine, antipain, pepstatine, 0.5mg/ml chacun et PMSF 1mM) pour éviter l'action des protéases sur les protéines des MV.

2.1.3 Isolation des vésicules matricielles

Les vésicules matricielles sont concentrées par centrifugations successives selon la méthode de HALE et al. (1983). Une première centrifugation à 500g pendant 20 min permet d'éliminer les cellules mortes et les gros débris. Le surnageant est ensuite centrifugé à 20,000g pour se débarrasser des débris plus gros que les vésicules matricielles. Les vésicules sont obtenues par centrifugation du dernier surnageant à 80,000g pendant 60 minutes.

2.2 Mesure de l'activité phosphatase alcaline

La mesure de l'activité phosphatase alcaline est effectuée selon la technique de LOWRY et al. (1954). Les

cellules sont séparées par l'action de la collagénase de type P et réparties proportionnellement pour le dosage de l'ADN et pour l'essai de la PA.

A 100µl d'une dilution de cellules, on ajoute 1ml du substrat, l'Orthophosphate disodique de nitro-4 phényle 4.5mM, dans un tampon diéthanolamine-HCl 0.1M, pH 9.75. Après une incubation de 30min à 25°C, la réaction est arrêtée en ajoutant 1ml de NaOH 2N. Après 10 minutes, l'absorbance à 405nm est mesurée sur un spectrophotomètre Spectronic 1001plus Milton Roy. Une courbe standard est effectuée avec des concentrations différentes de p-nitrophénol.

2.3 Mesure de l'activité pyrophosphatasique

La mesure de l'activité pyrophosphatasique est effectuée selon la technique de RYAN et al., (1986). Les cellules sont lavées 2 fois dans du DMEM et une fois avec du "Hank's balanced salts solution" (HBSS). Toutes les solutions sont faites avec de l'eau bidistillée, déionisée et filtrée sur charbon activé.

Le mélange de réaction consiste de:

- 640µl de pyrophosphate inorganique (PPi) 20mM
- 40µl de DMEM pH 7.4, tamponné avec Tris-HCl
- 0.2ml d' EGTA 40mM

- 8ml de MgCl_2 2mM
- Suffisamment de $[^{32}\text{P}]\text{PPi}$ pour produire au moins 10000cpm/100 μl

Ce mélange (8 ml) est ajouté à chaque vase de Pétris. Les Pétris sont incubés pendant 30 minutes à 37°C. Un témoin sans cellules est incubé dans les mêmes conditions.

La quantité de $[^{32}\text{P}]\text{PPi}$ hydrolysée durant l'incubation est déterminée par la précipitation différentielle du phosphate sous forme de phosphomolybdate par la triéthylamine.

A 200 μl des surnageants précédents, on ajoute séquentiellement en mélangeant sur un agitateur de type "vortexe":

- 10 μl de Na_2HPO_4 10mM
- 40 μl de acide perchloroacétique 1M
- 40 μl de molybdate d'ammonium 5%
- 10 μl de triéthylamine HCl 0.2M

Chaque microtube est centrifugé pendant 10 secondes à 8700g dans une centrifugeuse de table (microfuge Brinkmann Instrument Co.). Le surnageant est transféré dans un vial à scintillation de 20ml contenant 10ml de HCl 0.5M. Le précipité est lavé et centrifugé à deux reprises; le surnageant est chaque fois ajouté au vial correspondant. Le précipité est dissout dans 400 μl d'acétone et ajouté à 10ml de HCl 0.5M dans un vial. Les émissions Cerenkov sont

comptées sur un compteur à scintillation. Le pourcentage d'hydrolyse du témoin est soustrait de la valeur de l'échantillon.

2.4 Estimation par ELISA de la présence de PA

Les échantillons de cellules et les préparations contenant des vésicules matricielles sont soniqués 3 fois pendant 10 secondes à 4°C en présence du détergent NP-40 0.06%. Les échantillons de 50 à 200µl sont déposés séparément dans les puits d'une plaque ELISA.

La fixation de l'antigène PA dure toute la nuit à 4°C. Les puits sont alors lavés deux fois avec un tampon phosphate 10mM pH 7, contenant NaCl 150mM, 1% BSA et 0.2% Tween-20. Les sites de liaisons libres des puits sont bloqués pendant 2 heures à 37°C avec du PBS contenant 3% de BSA. Après deux lavages, les puits sont incubés 1 heure à 25°C avec l'anti-phosphatase alcaline (no:201-001-077 Jackson Immunoresearch Laboratories) 1:4000 dans du PBS contenant 3% de BSA et 0.2% de Tween20. Six lavages suivent. Une incubation avec l'anti-IgG de souris biotinylé 1:4000 (PBS, 3% BSA, 0.2% Tween-20) est effectuée pendant 1 heure à 25°C. Les puits sont lavés six fois, puis une incubation de 30 minutes à 25°C est effectuée avec la streptavidine conjuguée à la peroxydase 1:4000

Après six autres lavages, on incube avec le substrat de la peroxydase, l'ortho-phénylènediamine 1mg/ml dans un tampon citrate-phosphate 75mM pH 7.6 contenant 0.016% de peroxyde d'hydrogène. Quand la coloration est assez prononcée, on arrête la réaction avec 50µl de H₂SO₄ 4N. La lecture de l'absorbance se fait à 492nm à l'aide d'un Multiscan MCC/340 MKII (Titertek). Nous ne pouvons comparer deux ELISA, mais seulement les résultats des 96 puits différents qui constitue la plaque d'un ELISA

2.5 Mesure du contenu en ADN

La mesure de la quantité d'ADN se fait selon la technique d'ADAMS et STORRIE (1981). Pour faire éclater les cellules resuspendues dans la solution tampon (NaCl 0.2M, KCl 3mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 2mM), on ajoute 10µl de dodécyl sulfate de sodium 2% et ensuite, 2ml de bisbenzimidazole Hoechst 100ng/ml dans un tampon EDTA 10mM, Tris-HCl 10mM, NaCl 100mM. Une courbe standard est effectuée avec de l'ADN de thymus de veau à différentes dilutions. Ces opérations se font à l'abri de la lumière. Après une incubation de 20 minutes, la lecture de l'absorbance est prise sur un spectrofluorimètre (SPF-500C de SLM AMINCO) à une longueur d'onde d'excitation de 365nm et une longueur d'onde d'émission de 458nm.

2.6 Microscopie électronique

2.6.1 Étude de la calcification

Les vésicules matricielles, obtenues de cellules traitées 1 jour avec 3ng d'AR, sont incubées pendant 3 jours à 37°C dans un milieu de calcification : CaCl_2 2mM, KH_2PO_4 1.6mM, ATP 1mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1mM, NaCl 85mM, KCl 15mM, NaHCO_3 10mM et TES 50mM (HSU et ANDERSON, 1977). Les vésicules sont recentrifugées à 80 000g, et ensuite fixées et enrobées.

2.6.2 Fixation des échantillons biologiques

Pour l'observation des MV en microscopie électronique à balayage, les vésicules obtenues après centrifugation du surnageant sont déposées sur un support de carbone. Les MV sont fixées par un mélange de glutaraldéhyde 2.5%, d'acide osmique 1% dans un tampon cacodylate 0.1M, pH 7.3. Après trois lavages dans le tampon cacodylate, les vésicules sont déshydratées dans des bains successifs d'éthanol à 30%, 50%, 70%, 90%, 95% puis 100%. Les MV sont séchées par la technique de "critical point dryer" puis métallisées par une couche de 10nm de carbone. Les vésicules ont été observées à l'aide d'un microscope électronique à balayage de marque JEOL JSM 840A.

Pour la microscopie électronique à transmission, les cellules et les MV ont été fixées, lavées, déshydratées de la même façon que précédemment et enrobées dans de l'épon. Les coupes ultrafines colorées au citrate de plomb et à l'acétate d'uranyle, sont observées sur un microscope à transmission électronique de marque Philips 300.

2.7 Extraction et purification de la "retinol binding protein"

Les techniques suivantes proviennent du Dr. Bhat de l'Institut de recherches cliniques de Montréal.

2.7.1 Colonne de DEAE-cellulose

Un litre de plasma humain est placé dans des tubes à dialyse dans 10 litres de tampon (Na_2HPO_4 40mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10mM, NaCl 0.1M, pH 7.3) pendant 24 heures, 3 fois.

Le dialysat est chargé sur une colonne de 2.6 par 40 cm de DEAE-cellulose (DE-52) et lavé avec le tampon précédent. L'élution du complexe TTR-RBP se fait avec un gradient linéaire de NaCl (0.1 à 0.5M) dans le même tampon. Les pics de protéines sont détectés par lecture à 280nm sur le spectrophotomètre. Le pic TTR-RBP est détecté par spectrofluorimètre (excitation 315nm, émission 460nm).

2.7.2 Filtration sur gel

La fraction contenant le TTR-RBP est lyophilisée et resuspendue dans 5ml de Tris-acétate 1mM pH 8.3 (0.45g Tris/l et 0.1g/l d'acétate). A l'aide d'une colonne de 2.5cm par 120cm de Séphadex G-75 avec le tampon tris-acétate pH 8.3, on récupère les fractions séparées de RBP et de TTR qui sont identifiées par spectrofluorimétrie.

2.7.3 Colonne d'affinité TTR-sépharose

Une colonne d'affinité est ensuite préparée. Le TTR dissous dans une solution de (NaHCO_3 0.1M, NaCl 0.5M, pH 8.3) est ajouté à 1g de CNBR-sépharose et mélangé toute une nuit. Les groupes actifs restants sont bloqués avec le tampon Tris-HCl 0.1M, pH 8. La colonne TTR-sépharose est lavée par trois cycles de tampon acétate 0.1M pH 4 suivi du tampon acétate 0.1M pH 8. Le RBP dans du PBS (NaCl 0.14M, Na_2PO_4 10mM, pH 7.4) est chargé sur la colonne. Le RBP maintenant lié au groupe TTR est élué avec de l'eau déionisée. Le RBP est dialysé et conservé à -70°C .

2.7.4 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est effectuée avec un gel d'une épaisseur de 1 mm, comprenant un gel

séparateur de 5 cm de hauteur et un gel concentrateur de 1 cm de hauteur.

Dans les conditions usuelles (LAEMMLI, 1970), le gel séparateur est composé d'une concentration finale d'acrylamide de 10% et de bis-acrylamide (N,N'-méthylène-bis-acrylamide) de 0.27% pour un rapport mono/bis de 37.5.

Le gel contient aussi 0.1% de SDS, 375 mM de Tris-HCl, pH 8.7, 0.04% de persulfate d'ammonium (APS) et 0.05% de TEMED (N,N,N',N'-tétraméthylènediamine). Le gel concentrateur contient 4.27% d'acrylamide, 0.12% de bis-acrylamide, 0.1% de SDS, 125 mM de Tris-HCl, pH 6.8, 0.03% d'APS et 0.1% de TEMED.

Le RBP purifié est dissout dans un tampon contenant des concentrations finales de 10% de glycérol, 3% de SDS, 5% de β -mercaptoéthanol, 62.5 mM de Tris-HCl, pH 6.8 et 0.005% de bleu de bromophénol. La solution est bouillie durant 3 minutes. L'électrophorèse est réalisée dans un appareil "Mini Protean II Cell" (Bio-Rad) avec un tampon Tris 25 mM, pH 8.4, glycine 192 mM et SDS 0.1%, durant 1 heure à 165 Volt pour le gel d'acrylamide 10% ou 2 heures à 150 V pour le gel d'acrylamide 15%. Peu avant la fin de l'électrophorèse, une solution de pyronine 0.002% dans 20% de glycérol est déposée sur le gel dans le but de marquer l'emplacement des puits.

2.7.5 Coloration à l'argent pour l'estimation de la pureté du "retinol binding protein"

Les bandes protéiques sont révélés par coloration à l'argent (FORMAN et al., 1985). Après fixation, le gel est lavé 3 fois pour des périodes de dix minutes dans l'éthanol 10% et une fois pendant cinq minutes dans de l'eau bidistillée (25°C). Un réactif oxydant composé de dichromate de potassium 0.0034 M et d'acide nitrique 0.02% est ajouté pour une incubation de 8 minutes (25°C). Le gel est ensuite lavé 4 à 5 fois pour des périodes de 5 minutes dans de l'eau bidistillée ou jusqu'à décoloration complète. Le gel est incubé dans une solution de nitrate d'argent 12 mM pendant 40 minutes et le gel est rincé rapidement dans de l'eau bidistillée. La solution de développement contient du carbonate de sodium 0.28 M et 500 µl/l de formaldéhyde 37%; elle est ajoutée et remplacée plusieurs fois jusqu'à l'obtention de la coloration voulue. Le développement est arrêté en plaçant le gel dans une solution d'acide acétique 1%.

3. RÉSULTATS

3.1 Influence de l'acide rétinoïque sur les activités phosphatasiques de fibroblastes *in vitro*

3.1.1 Effect de l'acide rétinoïque sur l'activité phosphatase alcaline fibroblastique du ligament patellaire de lapin

Les fibroblastes du ligament patellaire de lapin ont été traités avec des concentrations d'acide rétinoïque (AR) croissantes pour d'abord vérifier l'effet de ce rétinoïde sur l'activité de la phosphatase alcaline (PA), un enzyme impliqué dans le processus de calcification. En une même étape, il nous est possible de choisir une concentration de travail, c'est à dire, une concentration qui modifie significativement l'activité PA, et qui sera utilisée pour des traitements de plus longue durée. Cette expérience est représentée graphiquement à la Figure 1. Nous observons une augmentation de l'activité PA avec l'augmentation de la concentration d'AR et nous avons choisi d'utiliser la concentration de 3ng/ml marquant la première élévation significative de l'activité PA.

Pour observer l'effet de la durée du traitement, les fibroblastes de lapin ont été traités de 0 à 2 jours avec 3ng/ml d'AR. L'activité PA de ces cellules a augmenté d'environ 600%, par rapport aux témoins, après le premier jour du traitement (Figure 2) puis a été suivi d'une baisse de l'activité le jour suivant. L'activité PA des vésicules

Figure 1 Effect de concentrations croissantes d'acide rétinoïque sur l'activité phosphatase alcaline des fibroblastes

Cette courbe montre la variation de l'activité phosphatase alcaline de fibroblastes patellaires de lapin en culture en fonction de la concentration d'acide rétinoïque utilisée lors d'un traitement d'un jour. L'activité PA est exprimée en nmol de p-nitrophénol libéré / mg de protéine / minute d'exposition des cellules avec la solution de orthophosphate disodique de nitro-4 phényle. Les barres verticales indiquent l'écart-type pour chaque point (n=3).

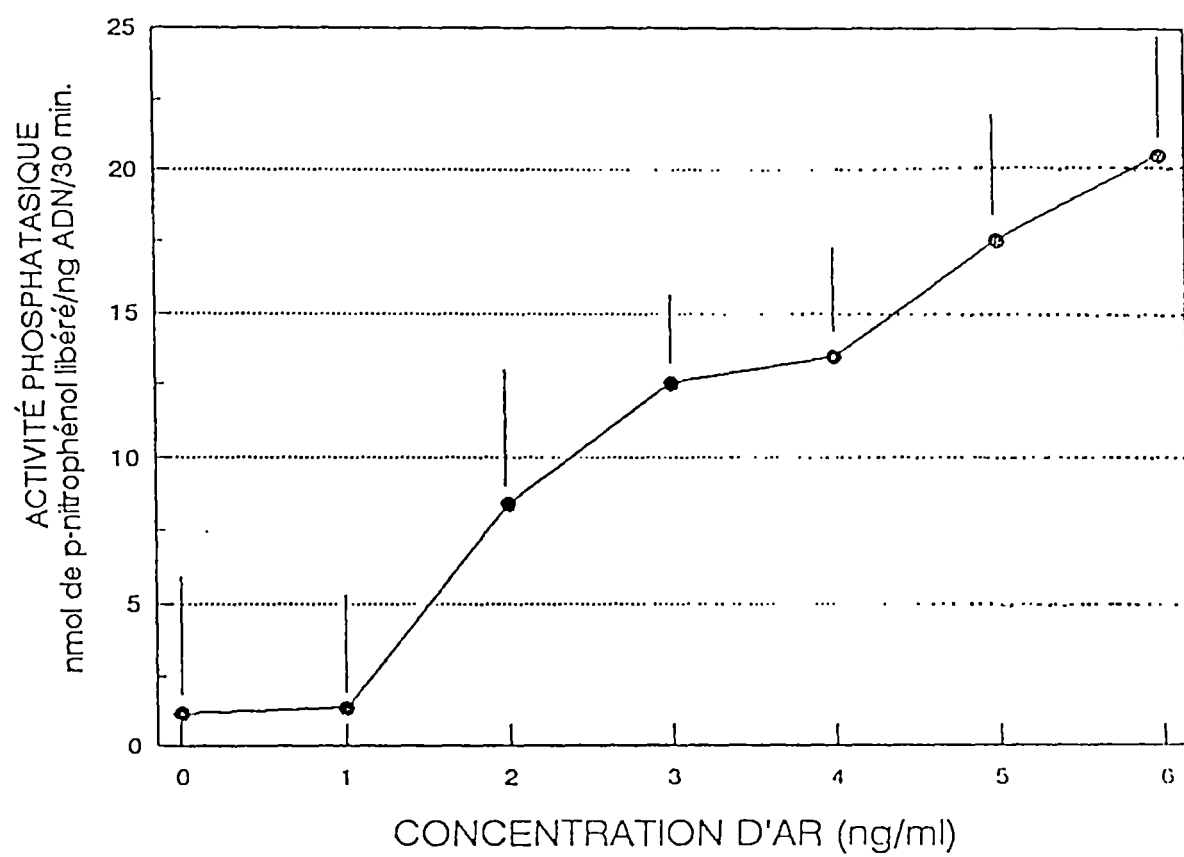
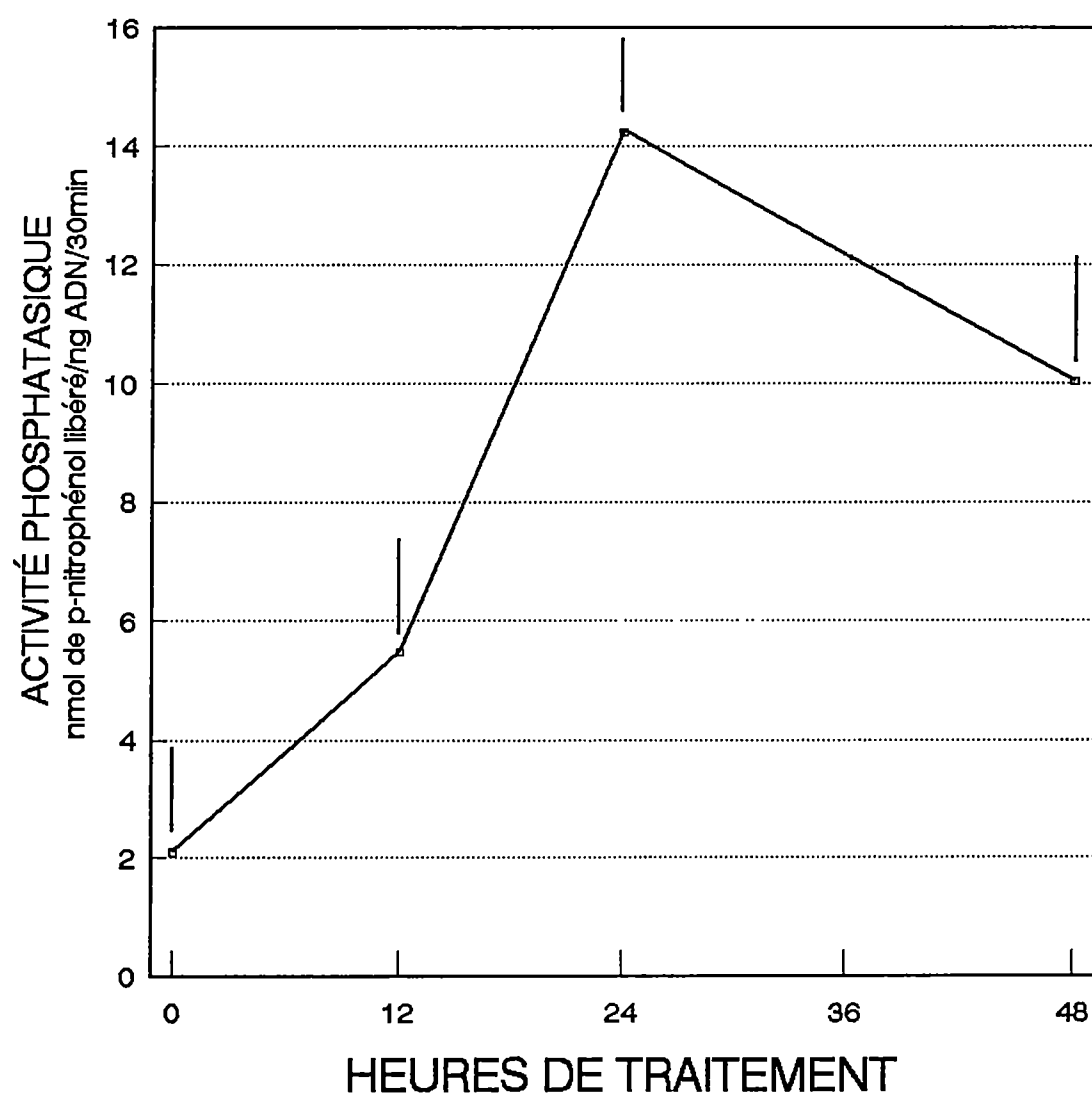


Figure 2: Activité phosphatase alcaline des fibroblastes de lapin en fonction du temps de traitement à l'acide rétinoïque

Cette courbe illustre la variation de l'activité phosphatase alcaline de fibroblastes patellaires de lapin en culture en fonction de la durée de traitement avec 3ng/ml d'acide rétinoïque. L'activité PA est exprimée en nmol de p-nitrophénol libéré / ng d'ADN / 30 minutes d'exposition des cellules à une solution de Orthophosphate disodique de nitro-4 phényle. Les barres verticales indiquent l'écart-type pour chaque point (n=3).



isolées du milieu de culture pour chaque jour est approximativement 10 fois plus faible que l'activité des cellules dont elles proviennent (Figure 3). L'activité PA des VM augmente, elle aussi, après 1 jour de traitement pour redescendre après 1 jour. Les deux courbes ont le même profil.

3.1.2 Effet de l'acide rétinoïque sur l'activité phosphatase alcaline fibroblastique du ligament patellaire et du ligament longitudinal antérieur humain.

Une expérience similaire montrant l'effet de l'AR sur l'activité de fibroblastes de foetus humain de 19 semaines provenant d'un ligament axial, le ligament longitudinal antérieur (LLA) et d'un ligament périphérique, le ligament patellaire (LP), a montré une activité PA inchangée par l'ajout d'AR dans le milieu de culture pour tous les points de la courbe à l'exception d'une baisse d'activité du LLA à 1 jour (Figure 4). Il y a une différence notable entre le niveau de l'activité du ligament axial et de l'activité du ligament périphérique pour tous les points de la courbe. L'activité du ligament périphérique est approximativement 7 fois plus faible que l'activité du ligament axial. L'activité PA des VM axiales et périphériques n'est pas modifiée par l'addition d'AR 3ng/ml (Figure 5). L'activité PA des VM des ligaments axiales est elle aussi significativement plus élevée que l'activité des ligaments périphérique.

Figure 3 Activité phosphatase alcaline des vésicules
matricielles de fibroblastes de lapin en fonction
du temps de traitement à l'acide rétinoïque

Cette courbe montre la variation de l'activité phosphatase alcaline des vésicules matricielles provenant de fibroblastes patellaires de lapin en fonction du nombre d'heures de traitement avec 3ng/ml d'acide rétinoïque. L'activité PA est exprimée en nmol de p-nitrophénol libéré / ng de DNA / 30 minutes d'exposition des VM à une solution de Orthophosphate disodique de nitro-4 phényle. Les barres verticales indiquent l'écart-type pour chaque point (n=3).

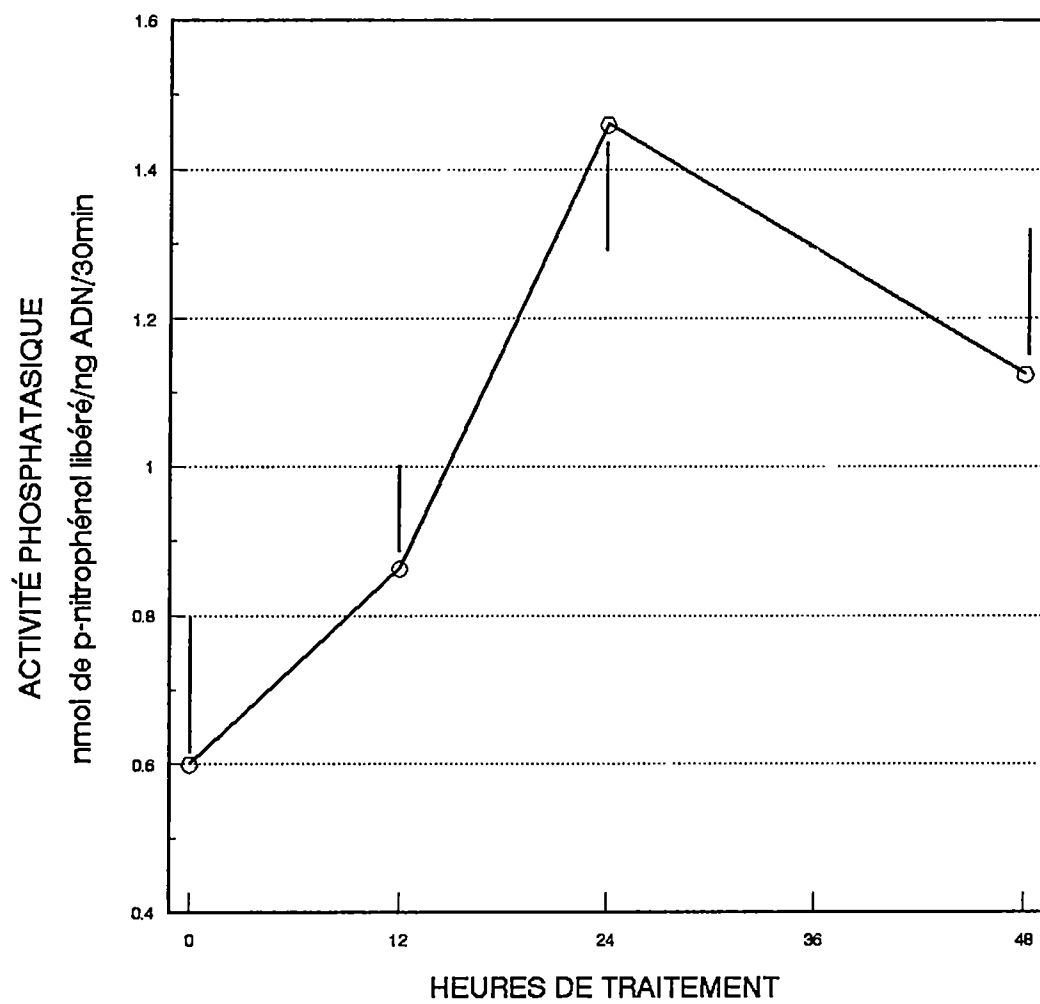


Figure 4 Activité phosphatase alcaline de fibroblastes humains axiaux et périphériques

Ce tracé illustre la variation de l'activité phosphatase alcaline des fibroblastes humains axiaux (LLA) et périphériques (LP) en fonction du nombre d'heures de traitement avec 3ng/ml d'acide rétinoïque. L'activité PA est exprimée en nmol de p-nitrophénol libéré / ng d'ADN / 30 minutes d'exposition des cellules à une solution de Orthophosphate disodique de nitro-4 phényle. Les barres verticales indiquent l'écart-type pour chaque point (n=3).

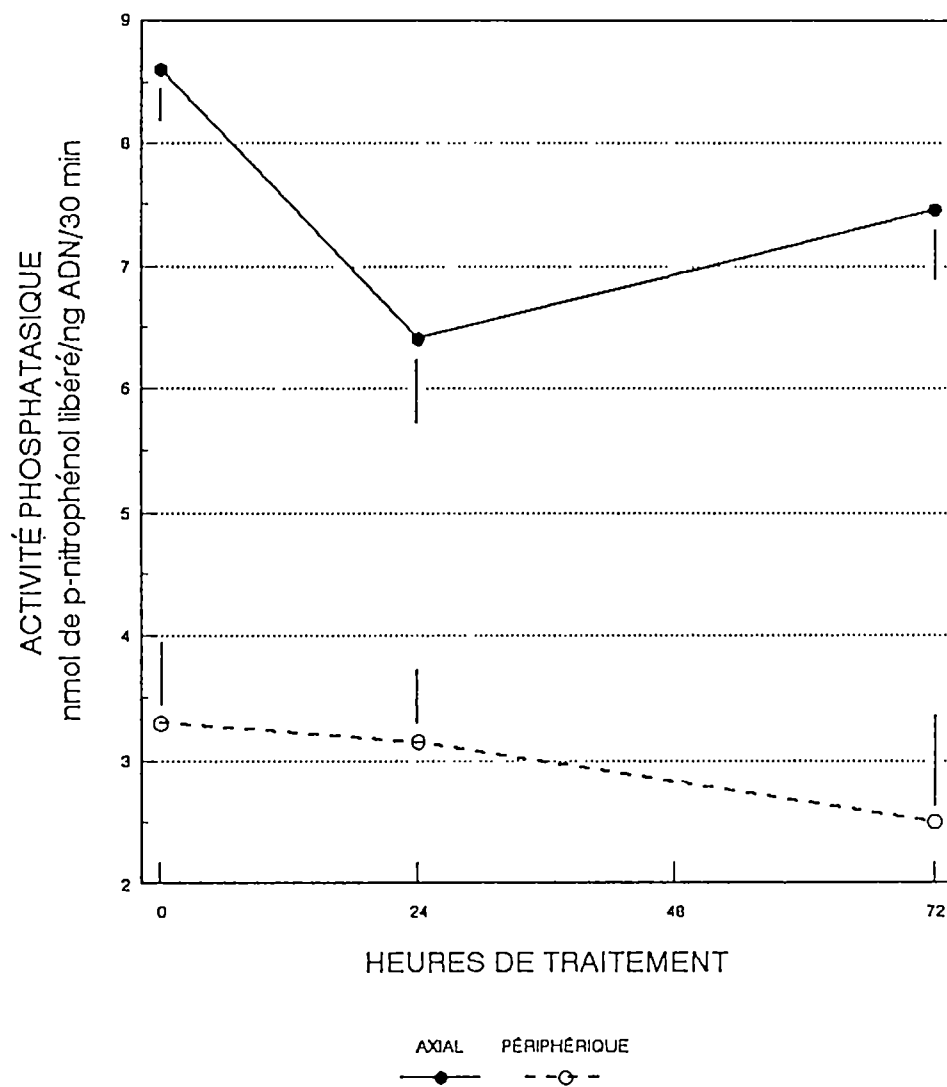
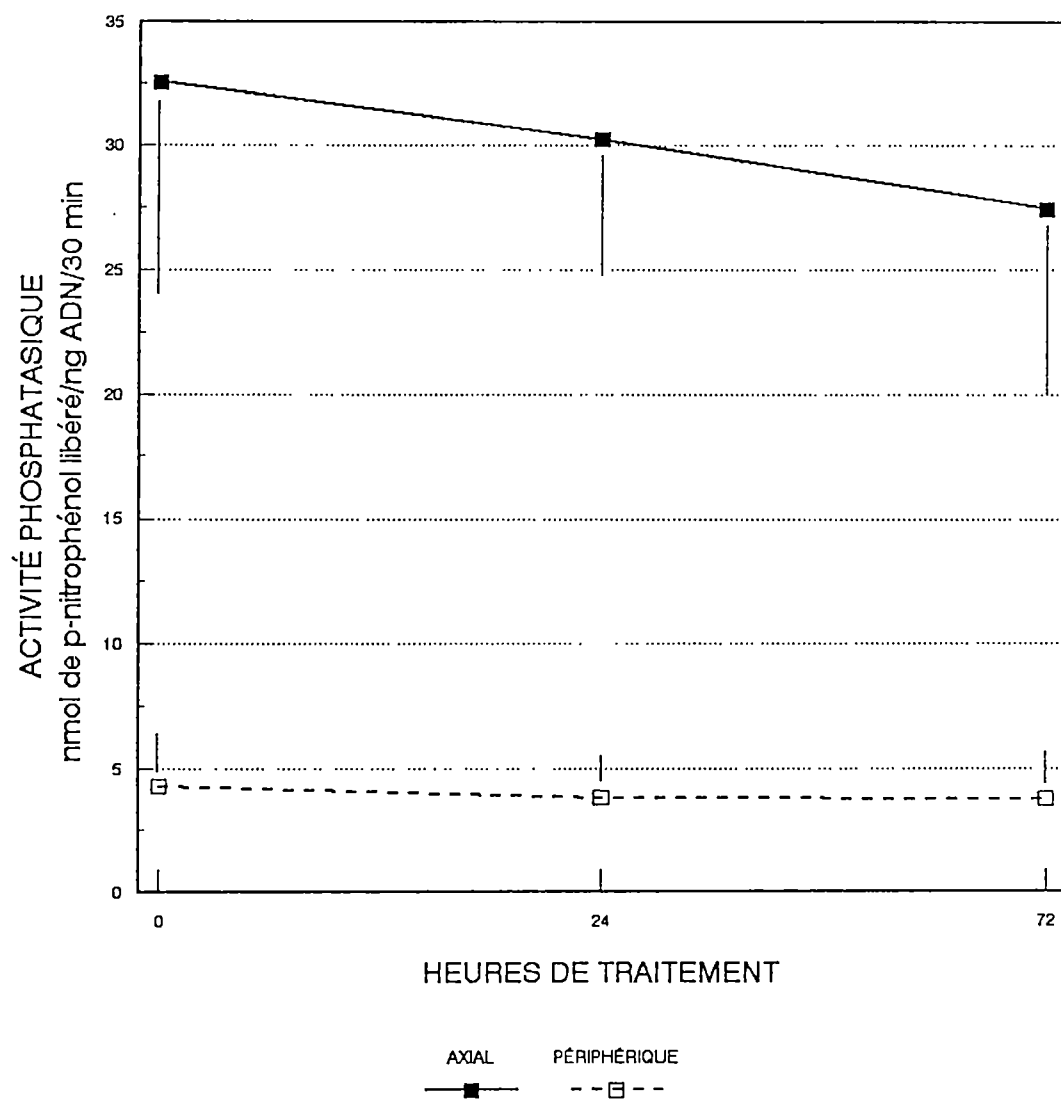


Figure 5 Activité phosphatase alcaline de vésicules matricielles de fibroblastes humains axiaux et périphériques

Variation de l'activité phosphatase alcaline des vésicules matricielles provenant de fibroblastes humains foetaux axiaux (LLA) et périphériques (LP) en fonction du nombre d'heure de traitement avec 3ng d'acide rétinoïque. L'activité PA est exprimée en nmol de p-nitrophénol libéré / ng ADN / 30 minutes. Les barres verticales indiquent l'écart-type pour chaque point (n=3).



3.1.3 Effet de l'acide rétinoïque sur l'activité pyrophosphatase fibroblastique du ligament patellaire de lapin.

L'activité pyrophosphatase (PPase) joue un rôle important dans l'étude du mécanisme de la calcification, puisque les pyrophosphates inhibent la nucléation des premiers cristaux de phosphate de calcium alors l'hydrolyse des pyrophosphates est nécessaire.

L'influence de l'AR sur la fonction PPase est montrée à la Figure 6. L'activité PPase est, comme l'activité PA, augmentée un jour après le début du traitement à l'acide rétinoïque (a). L'activité diminue ensuite pour atteindre le niveau de base au sixième jour. L'ajout d'un substrat, le pyrophosphate inorganique (PPi), maintient, en un plateau, l'activité maximum atteinte après 1 jour (b). Nous observons cependant un délai de la réponse avec l'addition d'ATP (c). Quand on ne donne aux cellules que de l'ATP sans ajouter de l'AR, l'activité PPase croît de façon linéaire avec les jours de traitement (d).

3.2 Estimation de la variation par l'acide rétinoïque du contenu cellulaire en phosphatase alcaline....

3.2.1 Variation par l'acide rétinoïque du contenu cellulaire de la phosphatase alcaline des fibroblastes du ligament patellaire de lapin

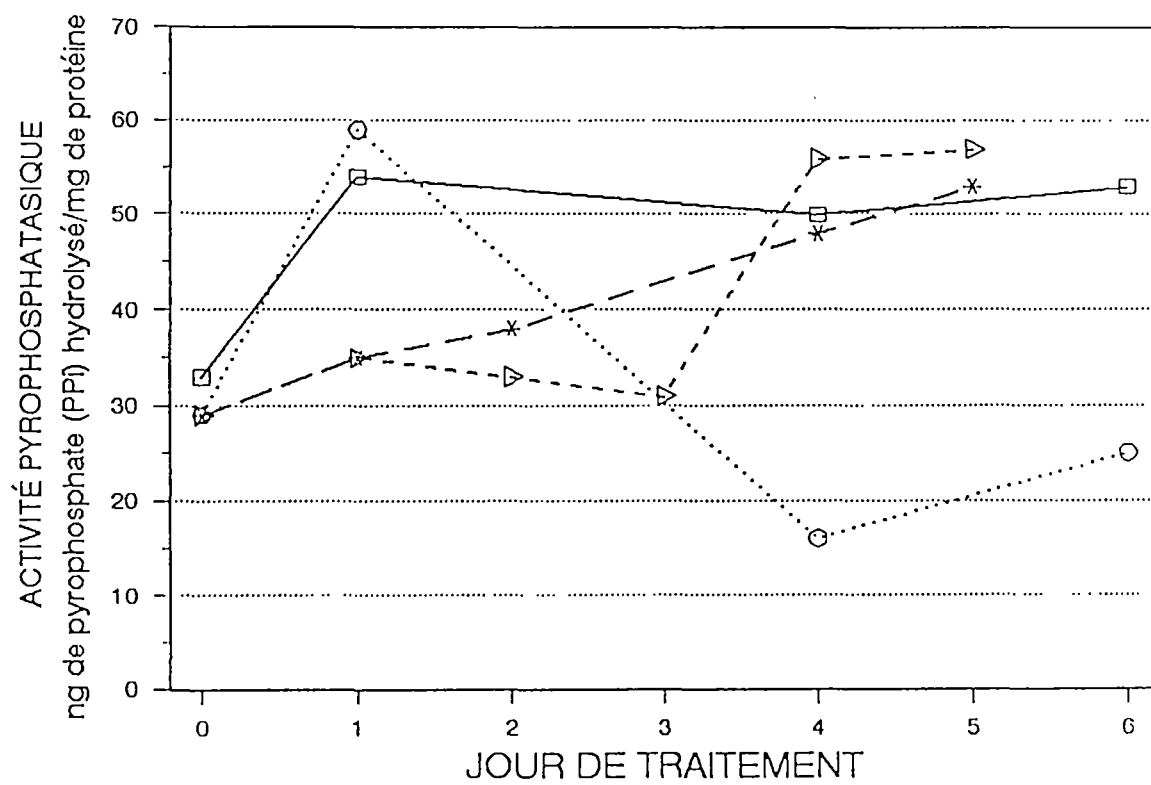
L'estimation du contenu cellulaire de la phosphatase alcaline à été effectuée avec un anticorps anti-phosphatase alcaline suivant une procédure d'ELISA. Vu l'absence d'un

Figure 6 Activité pyrophosphatasique de fibroblastes de lapin

Cette figure illustre les variations de l'activité pyrophosphatase de fibroblastes patellaires de lapin en fonction du nombre d'heures des traitements suivants :

- (a) [--o-- : Traitement avec AR 3ng/ml seulement]
- (b) [--□-- : Traitement avec AR 3ng/ml + PPi 3μM]
- (c) [••▷•• : Traitement avec AR 3ng/ml + ATP 3μM]
- (d) [--*-- : Traitement avec ATP 3μM seulement]

L'activité est exprimée en ng de pyrophosphate (PPi) hydrolysé / mg de protéine. Les barres verticales indiquent l'écart-type (n=3).



échantillon de PA pure, on ne peut qu'observer la variation de la quantité relative de PA. Chez le lapin (**Figure 7**), la courbe de variation de la quantité relative de PA des VM se superpose à la courbe de la variation d'activité observée chez les VM de lapin (**Figure 3**). Une variation non significative de la quantité relative de PA a été observée chez les fibroblastes de lapin. (**Figure 7**)

3.2.2 Variation par l'AR de la concentration membranaire de PA des fibroblastes du LP humain

Pour le foetus humain (**Figure 8**), la quantité relative de PA augmente de façon quasi-linéaire pour les fibroblastes ainsi que pour les vésicules jusqu'à 1 jour de traitement avec l'AR 3ng/ml. La quantité diminue par la suite. Il est à noter que nous n'avions pas observé d'augmentation de l'activité PA chez les fibroblastes et les VM de foetus humains. Chez le lapin, cependant, il y a corrélation du moins au niveau des VM entre la quantité et l'activité de l'enzyme PA mesurée et quantifiée dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées chez le lapin.

3.2.3 Localisation externe de la phosphatase alcaline des vésicules matricielles

A la **Figure 9**, nous observons l'influence de la sonication sur la membrane des vésicules matricielles provenant de fibroblastes patellaires de lapin traités une journée avec l'AR 3ng/ml.

Figure 7 Effet de l'acide rétinoïque sur le contenu cellulaire de la phosphatase alcaline de fibroblastes de lapin et des vésicules en fonction du temps d'incubation

L'histogramme suivant montre l'estimation par ELISA de la variation du contenu en phosphatase alcaline des fibroblastes du ligament patellaire (LP) de lapin et la variation du contenu en phosphatase alcaline des vésicules libérées en fonction du nombre d'heures d'incubation avec 3ng/ml d'acide rétinoïque. L'anticorps utilisé pour reconnaître l'antigène PA est un anti-phosphatase alcaline de souris. La reconnaissance est visualisée par l'association de l'anti-IgG de souris biotinylé, reconnu par la streptavidine conjuguée à la peroxydase, qui réagit avec l'ortho phénylènediamine pour donner une coloration quantifiable à 492nm. Les barres verticales indiquent l'écart-type (n=3).

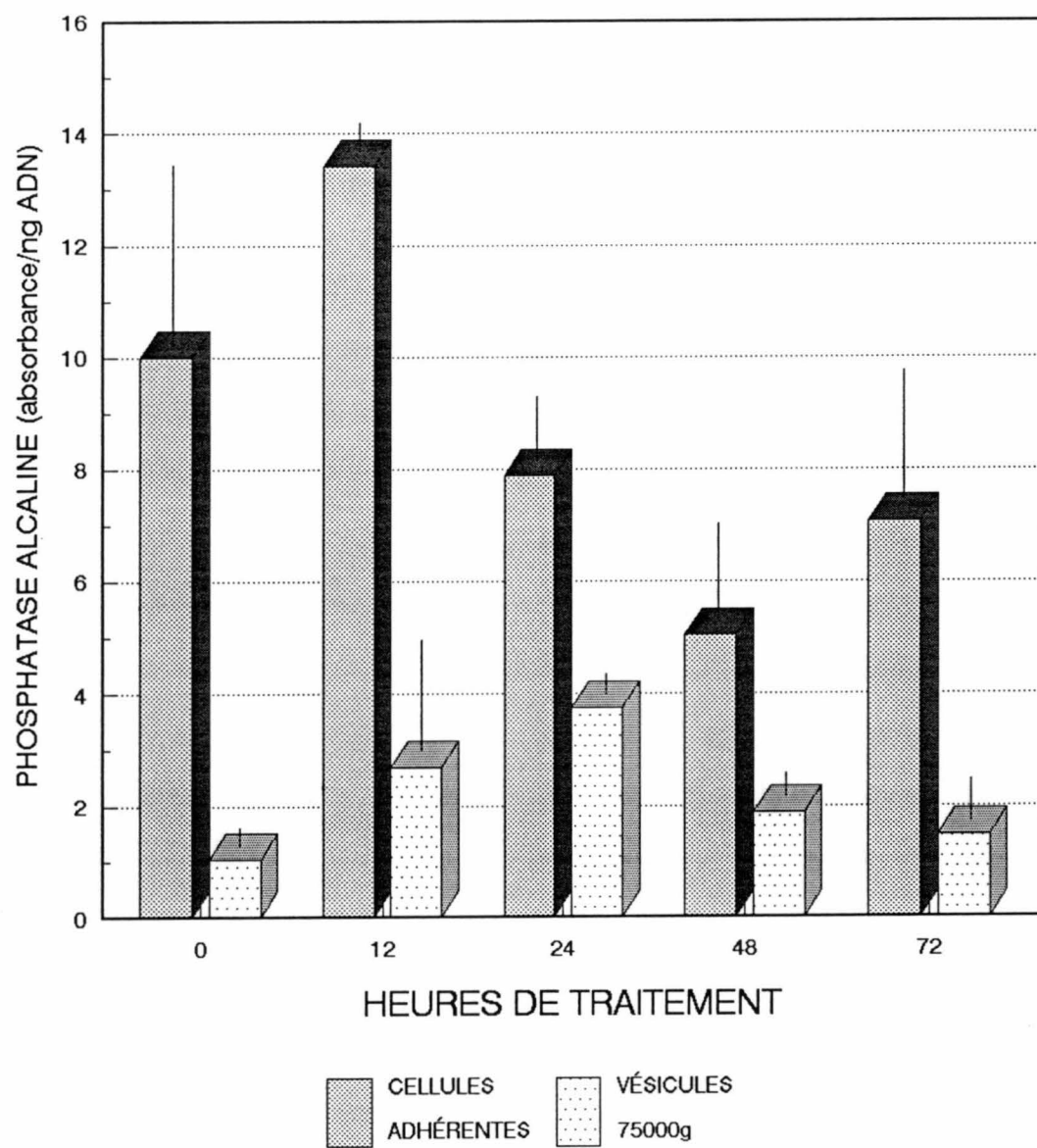


Figure 8 Effet de l'acide rétinoïque sur le contenu en phosphatase alcaline de fibroblastes humains et de leurs vésicules matricielles

L'histogramme suivant montre l'estimation par ELISA de la variation du contenu en phosphatase alcaline des fibroblastes du ligament patellaire humain foetal et la variation de contenu en phosphatase alcaline des vésicules libérées en fonction du nombre d'heures de traitement avec 3ng/ml d'acide rétinoïque. L'anticorps utilisé pour reconnaître l'antigène PA est un anti-phosphatase alcaline de souris. La reconnaissance est visualisée par l'association de l'anti-IgG de souris biotinylé, reconnu par la streptavidine conjuguée à la peroxydase, qui réagit avec l'ortho phénylènediamine pour donner une coloration quantifiable à 492nm. Les barres verticales indiquent l'écart-type (n=3)

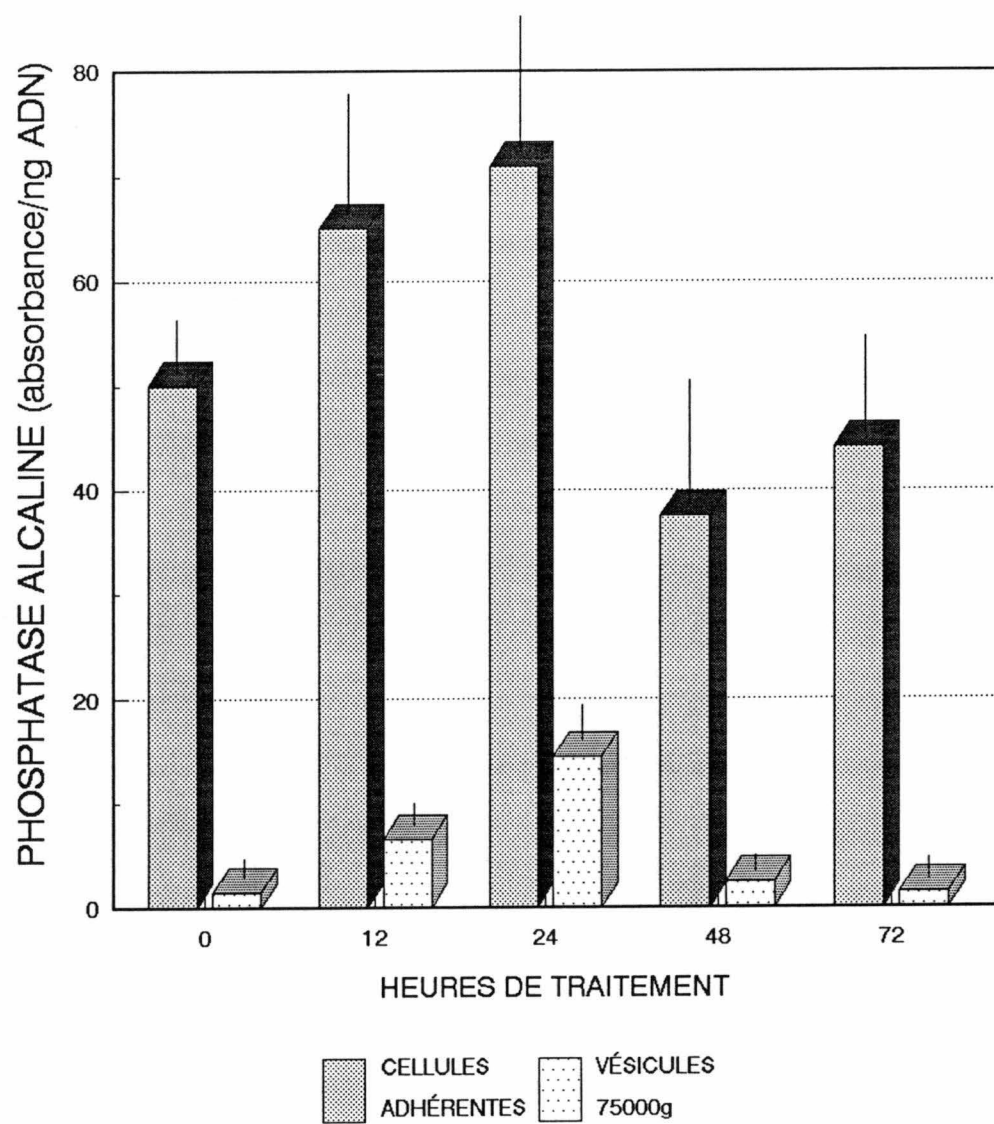
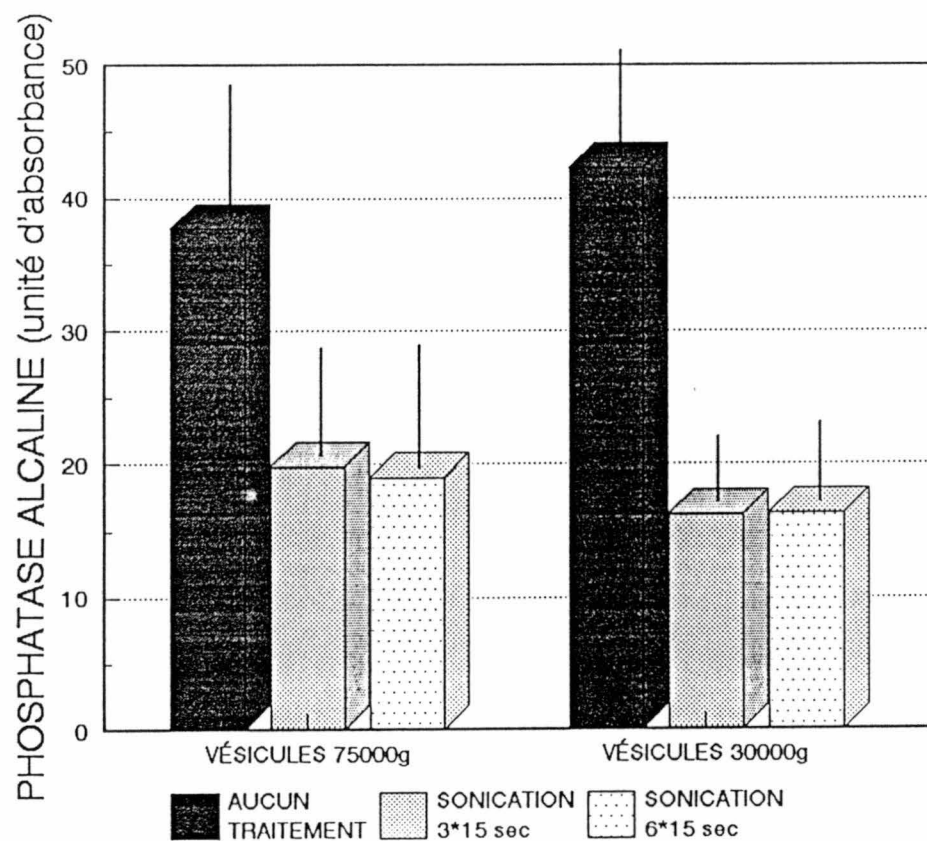


Figure 9 Localisation externe de la phosphatase alcaline sur les vésicules matricielles

L'histogramme suivant montre la localisation externe de la phosphatase alcaline sur la surface des VM libérées de fibroblastes patellaires de lapin traités une journée avec 3ng/ml d'AR. La sonication brise les VM et oblige une reformation aléatoire de nouvelles vésicules. Les vésicules récupérés à 7000g (plus grosses) et à 30000g (de 100nm de diamètre) présentent la phosphatase alcaline sur leur surface externe puisque la moitié de ce qui était détecté (aucun traitement) ne l'est plus après sonication. 50% de la phosphatase alcaline s'est relocalisé à l'intérieur et n'est plus détectable par l'anticorps. L'anticorps utilisé pour reconnaître l'antigène PA est un anti-phosphatase alcaline de souris. Cette reconnaissance est visualisée par l'association de l'anti-IgG de souris biotinylé reconnu par la streptavidine conjuguée à la peroxydase qui réagit avec l'ortho phénylènediamine pour donner une coloration quantifiable à 492nm. Les barres verticales indiquent l'écart-type (n=3).



Trois périodes de sonication de 15 secondes diminuent de moitié la reconnaissance de l'antigène PA par l'anti-PA. Une deuxième série de 3 sonications ne modifie pas le résultat.

3.3 Observations microscopiques de la calcification des vésicules matricielles

Nous avons observé en microscopie électronique à balayage des vésicules de 100nm de diamètre moyen récupérées du milieu de culture des fibroblastes (résultat non montré). L'estimation du diamètre des vésicules isolées du surnageant des cellules en culture permet de vérifier la technique de séparation des vésicules par ultracentrifugation .

Dans une expérience préliminaire de la calcification, nous observons des cristaux dans le milieu d'incubation des vésicules issues des fibroblastes LP de lapin traités à l'AR 3ng/ml durant 1 jour. Nous n'observons pas de cristal dans la préparation de vésicules provenant de cellules non-traitées. Les résultats ne sont pas montrés puisque l'analyse de la matière cristalline n'est pas effectuée.

3.4 Purification du "retinol binding protein" humain

L'isolation et la purification du RBP à partir du plasma humain sont présentées sous formes d'élutions par différentes chromatographies de séparation. La première

élution provenant de la colonne de DEAE-cellulose n'a donné qu'un seul pic visible à une longueur d'onde d'excitation de 315nm et à une longueur d'onde d'émission de 460nm. La Figure 10 représente l'élution de la deuxième colonne, la filtration sur gel Sephadex G75. Nous observons deux pics d'élution puisque l'étape de diafiltration précédente, en plus de concentrer, dissocie le complexe par élévation du pH à 8.3. La deuxième bande d'élution de la filtration sur gel contient le RBP identifié par électrophorèse. Ce pic contenant le RBP est passé sur une colonne d'affinité TTR-sépharose pour une plus grande purification. La Figure 11 représente le profil d'élution de la chromatographie d'affinité. Le dernier pic contient la RBP purifiée; les deux premiers pics ne sont pas identifiés. Une partie du 50mg de la RBP lyophilisée provenant de la chromatographie d'affinité a subi une électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant. Le résultat de l'électrophorèse est coloré à l'argent. A l'aide de marqueurs de poids moléculaires, nous avons estimé un poids moléculaire d'environ 21 kDa pour la bande provenant de la purification du RBP (résultats non-montrés)

Figure 10 Purification du "retinol binding protein"
par filtration sur gel

La fraction contenant le TTR-RBP provenant de la filtration sur DEAE-cellulose a été fractionnée sur une colonne de filtration sur gel Séphadex G-75. Le profil d'élution a été déterminé par lecture de l'absorbance à 280nm. La "retinol binding protein" a été identifié par électrophorèse.

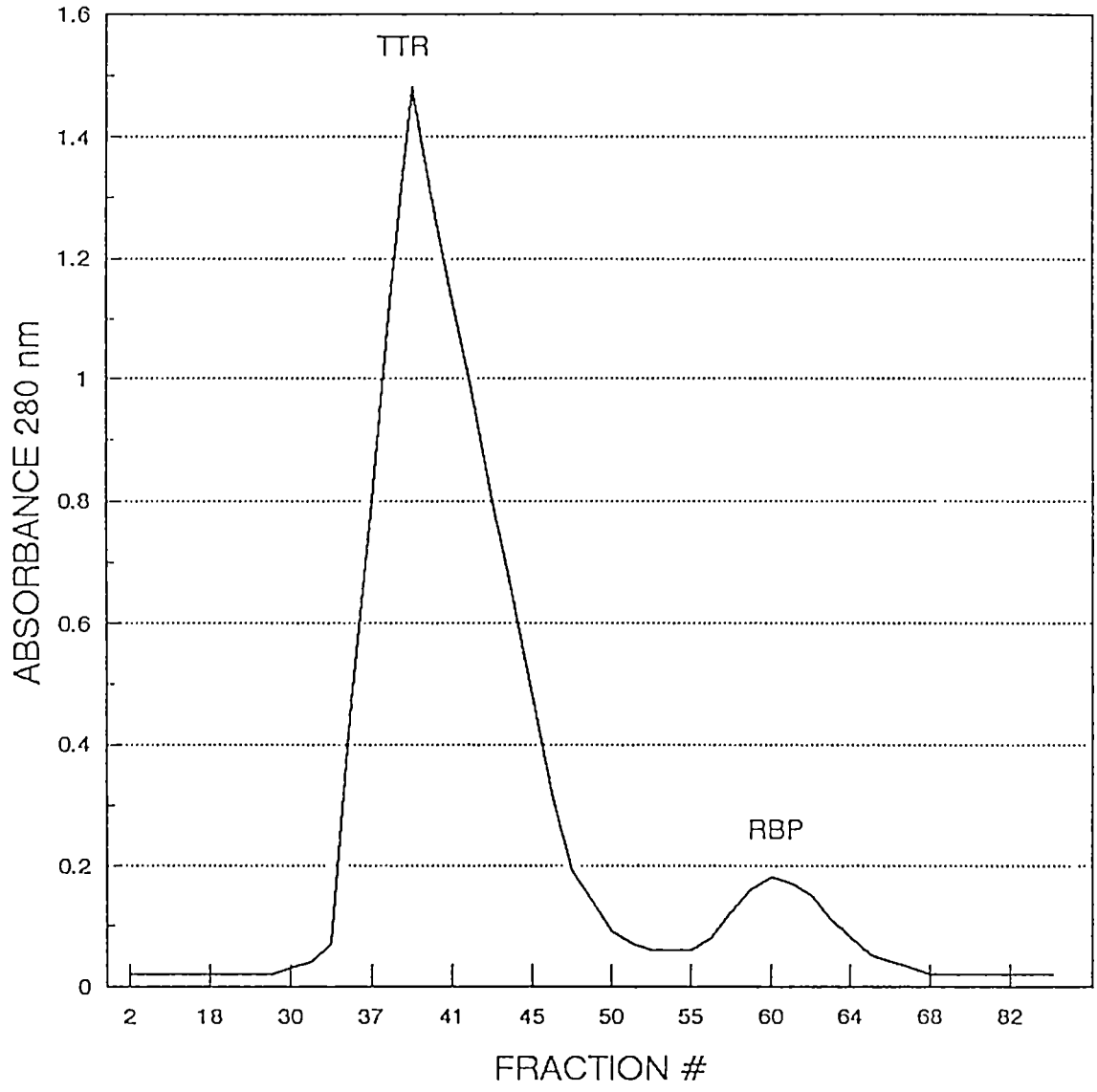
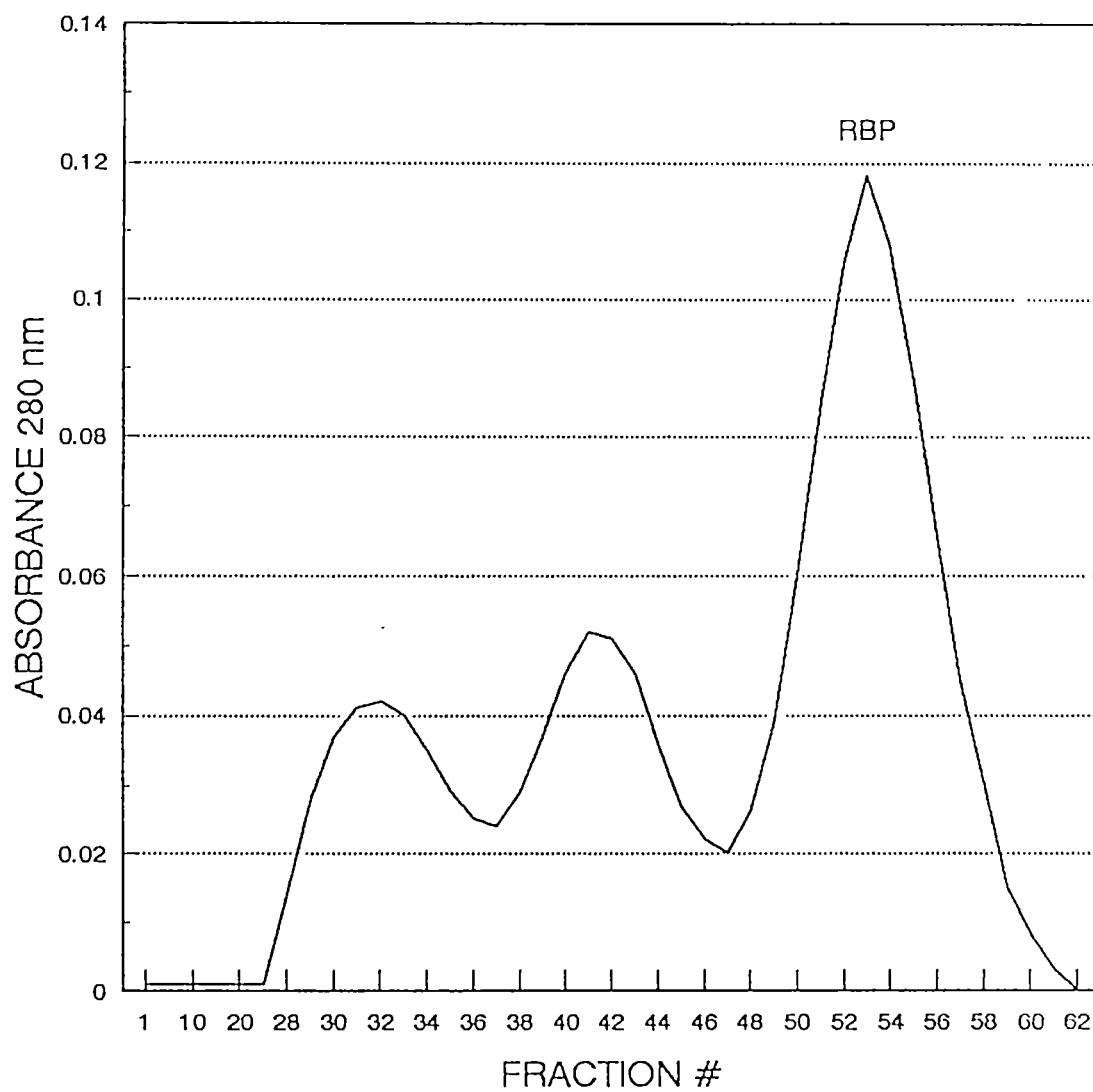


Figure 11 Purification du "retinol binding protein" par chromatographie d'affinité

La fraction contenant le RBP provenant de la filtration sur gel de Sephadex G-75 a été fractionnée de nouveau sur la colonne d'affinité TTR-Sépharose. Le profil d'élution a été déterminé par lecture de l'absorbance à 280nm. Le pic d'élution identifié RBP correspond à une protéine de poids moléculaire de 21 KDa. Ce poids a été estimé par une électrophorèse sur gel dénaturant de polyacrylamide 10% (Résultats non-présentés) Les deux premiers pics d'élution ne sont pas identifiés. Le pic RBP a été identifié par électrophorèse.



4. DISCUSSION

La calcification dépend essentiellement d'un environnement propice et indispensable à la nucléation du premier cristal de phosphate de calcium. La majorité des études de calcification ont utilisé un modèle animal et des techniques de microscopie optique et électronique pour suivre la séquence de minéralisation. Les animaux sont soumis à des conditions menant à l'évolution de structures calcifiées au niveau de l'appareil locomoteur. C'est le modèle d'hyperostose alimentaire induit par l'ingestion de palmitate de rétinol par le rat Lewis (LUSSIER et al., 1989; CHRISTI et al., 1957; ENGLISH et al., 1964; SEAWRIGHT et al., 1965) qui nous a permis d'observer une ossification significative des vertèbres lombaires, thoraciques et cervicales et une calcification du ligament longitudinal antérieur.

A ce point, l'identification d'un lien entre une élévation du rétinol et de l'acide rétinoïque plasmatique chez les hyperostotiques, associée à une calcification de ligaments *in vivo* et l'activité phosphatase alcaline des ligaments est à confirmer. L'activité phosphatasique est impliquée dans le processus de calcification de plusieurs tissus et elle est bien connue depuis 1923 (ROBINSON, 1923; SALOMO, 1974).

La technique de culture de cellules nous a permis d'isoler en un système clos des cellules fibroblastiques d'origine ligamentaire. Cette culture cellulaire favorise le contrôle des paramètres tel l'addition d'acide rétinoïque tout en éliminant la régulation systémique qu'implique un système *in vivo*.

Nous observons une modulation de l'activité phosphatase alcaline par l'acide rétinoïque chez les fibroblastes de lapin qui n'est pas reproduite chez le fœtus humain. Des concentrations croissantes d'acide rétinoïque sont responsables de l'augmentation d'activité PA des fibroblastes de lapin traités.

Nous avons choisi d'utiliser une concentration d'acide rétinoïque qui module significativement l'activité PA et qui entre dans la fourchette de concentrations observées *in vivo* chez les patients hyperostotiques. C'est avec deux fois la concentration plasmatique moyenne des individus normaux, environ 1.5ng/ml, c'est à dire 3ng/ml, que nous avons rencontré ces deux exigences. Dernièrement, PERIQUET et al. (1991) ont déterminé des concentrations plasmatiques de 4.4ng/ml d'AR tout-trans et de 1.5ng/ml d'AR 13-cis chez les patients hyperostotiques par rapport à des concentrations de 3.5ng/ml d'AR tout-trans et de 2.7ng/ml d'AR 13-cis chez les sujets normaux.

La littérature ne documente pas encore ce qui déclenche la libération de vésicules matricielles par les cellules spécialisées de types fibroblastes, chondrocytes ou ostéoblastes. Plusieurs études microscopiques présentent des tissus minéralisés en présence de ces minuscules structures d'origine membraire d'environ 100nm de diamètre. Puisque toutes les cellules excrètent dans le milieu extracellulaire des vésicules d'excrétion, nous avons voulu savoir pourquoi certaines de ces vésicules sont enrichies en PA et ont la capacité de se minéraliser *in vivo*. Nous avons alors étudié l'influence de l'acide rétinoïque 3ng/ml sur l'activité PA des cellules d'origine ligamentaire et sur l'activité PA des vésicules sécrétées. Ces vésicules n'ont pas la capacité de s'ossifier normalement *in vivo*.

Nous observons que les fibroblastes patellaires de lapin soumis à 3ng/ml d'acide rétinoïque ont une activité PA augmentée pour atteindre un maximum d'activité après un jour de traitement. A ce point, nous avons décrit pour la première fois un effet d'induction de l'activité de la PA par l'acide rétinoïque sur des cellules ligamentaires patellaires de lapin. Cette constatation est de plus très intéressante puisque l'activité PA est de la même façon augmentée au niveau des vésicules issues de ces cellules traitées (PERRON et al., 1992). Les deux courbes d'activation arborent la même allure. Nous décrivons donc

un modèle *in vitro* de culture de fibroblastes dans lequel l'AR peut induire la formation de vésicules qui ont une caractéristique similaire à celle observée chez les vésicules matricielles décrites dans la littérature; dans les deux cas, on observe une activité PA enrichie. L'acide rétinoïque active-t-il la PA? Favorise-t-il la présence de PA sur la membrane ou augmente-t-il la transcription du gène de la PA pour favoriser sa synthèse ?

La reconnaissance de la PA par l'anti-phosphatase alcaline nous permet de constater que non seulement l'activité phosphatasique, mais aussi le contenu en PA, déterminée par un test ELISA, sont augmentées par le traitement des fibroblastes avec l'acide rétinoïque. La quantité de PA est augmentée au niveau cellulaire et aussi au niveau des vésicules de sécrétion récupérées dans le milieu extracellulaire; sauf pour le lapin où l'on n'observe pas la hausse au niveau cellulaire. Nous pourrions suggérer que la PA nouvellement synthétisée serait tout de suite regroupée dans une région membranaire qui, par "budding off" formerait une nouvelle VM enrichie en PA. Ainsi l'enrichissement au niveau cellulaire serait plus difficilement perceptible qu'au niveau des VM. La transcription de la phosphatase alcaline doit être le point le plus important pour expliquer la modulation de son activité par l'acide rétinoïque . Une observation par "Northern blot" de l'augmentation du mARN de la PA, parallèle à une étude de l'augmentation de l'enzyme PA par

immunobuvardage pourrait, dans un travail ultérieur, démontrer que l'induction du mARN par l'AR est associée à l'augmentation de PA (SCHREIBE et al., 1991).

Le dosage de la fonction pyrophosphatase (PPase) des fibroblastes patellaires de lapin nous indique que l'activité PPase est aussi augmentée après un jour de traitement avec 3ng d'acide rétinoïque, et qu'elle est maintenue élevée en présence d'une concentration constante de pyrophosphate inorganique (PPI). L'activité PPase est importante dans le processus de calcification puisque le PPI est un inhibiteur de la formation de cristaux de l'hydroxyapatite. L'observation des pics d'activité PPase et PA synchronisés à un jour, laisse suggérer l'action d'un même enzyme (PERRON et al., 1991 et 1992)

La réduction de l'activité PA et PPase ainsi qu'une baisse du contenu membranaire de la PA sont observées au deuxième jour de traitement. La perte de la reconnaissance de la PA par son anticorps est cependant plus rapide au niveau cellulaire dès le jour 1 de traitement, plutôt qu'au deuxième jour pour sa localisation sur les vésicules. Ces baisses de reconnaissance de la PA par l'anticorps et les baisses d'activités peuvent être dues à la dégradation de l'enzyme par des protéases malgré l'ajout d'inhibiteurs de protéases (CLAP) au surnageant durant l'entreposage des vésicules.

Des cellules provenant des ligaments patellaires et du ligament longitudinal antérieur de fœtus humain ont aussi servi pour l'étude de l'action de l'acide rétinoïque sur l'activité de la PA.

L'acide rétinoïque, du moins à la concentration de 3ng/ml, n'a pas modulé l'activité de la phosphatase alcaline foetale. Les conditions utilisées sont favorables au bon fonctionnement d'un enzyme foetal puisque nous observons une activité du même ordre que l'activité PA des fibroblastes de lapin. Il est possible néanmoins que l'activité PA foetale ne soit pas modulée par l'AR à cette faible concentration. Cependant, la quantité de PA estimée par test ELISA démontre qu'à l'instar de l'augmentation observée chez les cellules de lapin, la quantité de PA est augmentée significativement par le traitement, au niveau cellulaire et au niveau vésiculaire. Les conditions utilisées pour le dosage enzymatique de la PA foetale sont probablement compatibles avec le fonctionnement de l'enzyme mais la PA foetale possède peut-être une activité ou un fonctionnement inconnus durant la différenciation induite par l'acide rétinoïque (SCHEIBE et al., 1991).

L'hyperostose se caractérise par une production anormale d'os, engainant surtout le rachis dorso-lombaire mais aussi les articulations périphériques (RESNICK et al., 1978). L'observation d'une activité PA de base plus élevée au niveau du ligament axial qu'au niveau du

ligament périphérique pourrait expliquer la prévalence décrite par Resnick. Nous avons observé une activité PA du ligament axial deux fois supérieure à l'activité PA du ligament périphérique des fibroblastes foetaux, alors qu'au niveau des vésicules, le rapport est de six. Il semble donc que l'activité PA, en plus d'être plus grande au niveau du ligament axial, se concentre davantage dans les vésicules axiales que dans les vésicules du ligament périphériques par un phénomène inconnu. Cette accumulation dans les vésicules axiales renforce davantage le concept de prévalence de l'ossification au niveau du ligament axial.

Nous observons des vésicules enrichies en PA et nous démontrons par une simple étude de reformation des vésicules brisées par sonication que la PA est située sur la surface externe de ces vésicules, tout comme les vésicules matricielles décrites dans la littérature, mais nous ne savons toujours pas si ces vésicules peuvent se calcifier. Une étude de calcifiabilité des vésicules provenant de cellules du ligament axial de lapin, décrite dans la section 2.6, nous a permis d'obtenir des résultats préliminaires à ce sujet. Nous avons observé des cristaux ressemblant à de l'hydroxyapatite dans le milieu d'incubation contenant les vésicules issues des fibroblastes du ligament patellaire de lapin traitées à l'acide rétinoïque à la concentration de 3ng/ml. Nous n'observons pas cette matière cristalline dans

l'autre préparation contenant les vésicules provenant de cellules non-traitées.

Les résultats ne sont pas présentés puisqu'il s'agit seulement de photographies en microscopie électronique à balayage et qu'il faudrait d'abord avoir accès à un microscope à transmission analytique capable d'identifier et de quantifier les éléments contenus dans cette matière minérale pour affirmer ou nier la présence d'hydroxyapatite.

L'extraction et la purification de la "retinol binding protein" nous a permis d'obtenir environ 0.1g de RBP après la lyophilisation. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide présente une seule bande distincte signifiant un haut niveau de purification. Dépendamment de l'utilisation ultérieure du RBP, d'autres étapes de purification seront peut-être nécessaires.

Beaucoup de voies futures s'ouvrent à l'investigation dans ce domaine. Dans le but de nous assurer du rôle protecteur du RBP au niveau de la toxicité membranaire du rétinol, les mêmes expériences pourraient être tentées avec le rétinol seul ou couplé au RBP que nous avons purifié. L'utilisation de ligaments provenant d'humains adultes nous permettrait d'étudier l'hyperostose sur des cellules plus susceptibles de s'ossifier puisque la maladie est observée exclusivement chez l'adulte. L'utilisation d'un microscope à transmission analytique permettrait l'identification de la

substance minérale comme étant de l'hydroxyapatite et ainsi la démonstration de la calcifiabilité des vésicules obtenues par le traitement à l'AR des fibroblastes.

5. CONCLUSION

Le traitement de fibroblastes ligamentaires de lapin avec 3ng/ml d'acide rétinoïque, correspondant à la concentration plasmatique de patients hyperostotiques, module l'activité de la phosphatase alcaline au niveau cellulaire et plus particulièrement au niveau des vésicules dites matricielles. Cette augmentation d'activité est accompagnée d'une augmentation de la quantité de la PA aux niveaux cellulaire et vésiculaire. La PA est située sur la surface externe des vésicules issues des cellules de lapin traitées pendant un jour avec l'AR. Une étude préliminaire de calcifiabilité des vésicules enrichies en PA a montré la formation d'une matière minérale ressemblant à de l'hydroxyapatite.

Avec des fibroblastes foetaux humains, la quantité de PA est augmentée par le traitement avec 3ng/ml d'AR mais pas l'activité de la PA. L'activité PA du ligament axial est deux fois plus grande que l'activité du ligament périphérique et l'activité des vésicules isolées des fibroblastes du ligament axial est six fois supérieure à l'activité du ligament périphérique. Cette prépondérance d'activité PA du ligament axial peut être mise en relation avec la prépondérance des atteintes axiales dans la maladie hyperostotique.

Nous avons mis au point un modèle de formation de vésicules matricielles *in vitro* par traitement à l'acide rétinoïque de fibroblastes ligamentaires qui permettra de faire une multitude d'expériences dans le domaine de l'ossification en éliminant les techniques d'extraction de vésicules à partir de tissus ossifiés. De plus, il nous sera possible d'étudier les premières phases de nucléation des cristaux de phosphate de calcium en absence de cristaux préexistants provenant d'une extraction.

BIBLIOGRAPHIE

ABITEBOUL, M., LUSSIER, A., BILLON, B., DRAPEAU, G. et PETITCLERC, C. (1985) Hyperostose vertébrale et troubles du métabolisme du rétinol. *Rev. Rhum.* 52: 141-143.

ADAMS, C.J. et STORRIE M. (1981) A simple DNA-dependent fluorescence enhancement assay for cell number. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 326-328.

ADAMS, S. et MELNYKOVYCH, G. (1985) Synergistic stimulation of alkaline phosphatase activity in bovine aortic endothelial cells grown in the presence of retinoids and glucocorticoids. *J. Cell Physiol.* 124: 120-124.

ADAMS, S., BISHOP, E. et MELNYKOVYCH, G. (1986) Elevation of alkaline phosphatase by retinoid in bovine endothelial cells and its possible relationship to lipid biosynthesis. *Biochem. Biophys. Acta* 885: 146-153.

AKISAKA, T., SHIGENAGA, Y. (1983) Ultrastructure of growing epiphyseal cartilage processed by rapid freezing and freeze-substitution. *J. Electron. Microsc.* 32: 305-320.

- AKISAKA, T., GAY, C.V. (1985) Ultrastructural localization of calcium-activated adenosine triphosphatase (Ca^{2+} -ATPase) in growth plate cartilage. J. Histochem. Cytochem. 33: 925-932.
- AKISAKA, T., GAY, C.V. (1986) Ultrastructural demonstration of p-nitrophenyl phosphatase (p-NPPase) activity in the epiphyseal cartilage growth plate. Acta Histochem. Cytochem. 19: 21-29.
- AKISAKA, T., SUBITA, G.P., SHIGENAGA, Y. (1986) Ultrastructural observations on chick bone processed by quick freezing and freeze-substitution. Cell. Tissue. Res. 247: 469-475.
- ALI, S.Y., SAJDERA, S.W., ANDERSON, H.C. (1970) Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. Proc. Natl. Sci. USA 67: 1513-1520.
- ALI, S.Y. Matrix vesicles and apatite nodules in arthritic cartilage. Dans D.A. Willoughby, J.P. Giroud, G.P. Velo (Eds): Perspectives in inflammation . Future Trends and Developments. MTP Press Ltd, Lancaster England. (1977) p.221-223.

- ALI, S.Y., EVANS, L. (1977) The uptake of [^{45}Ca] calcium ions by matrix vesicles isolated from calcifying cartilage. *Biochem. J.* 134: 647-650.
- ALI, S.Y., WISBY, A., CRAIG-GRAY, J. (1978) Electron probe analysis of cryosections of epiphyseal cartilage. *Metab. Bone Dis. Res.* 1: 97-103.
- ALLAN, D., THOMAS, P. (1981) Ca^{2+} -induced biochemical erythrocytes and their relation to microvesiculation. *Biochem. J.* 198: 433-440.
- ANDERSON, H.C. (1969) Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J. Cell Biol.* 41: 59-72.
- ANDERSON, H.C., MATSUZAWA, T., SAJDERA, S.W. et ALI, S.Y. (1970) Membranous particles in calcifying cartilage matrix. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 32: 619-630.
- ANDERSON, H.C., CECIL, R., SAJDERA, S.W. (1975) Calcification of rachitic rat cartilage by extracellular matrix vesicles. *Am. J. Pathol.* 74: 237-253.

ANDERSON, H.C. Matrix vesicles of cartilage and bone. Dans G.H. Bourne (Ed): The biochemistry and physiology of bone. Vol.4, Ed.2. Academic Press, New York (1976) p.135

ANDERSON, H.C., SAJDERA, S.W. (1976) Calcification of rachitic cartilage to study matrix vesicle in function. Fed. Proc. 35: 148-153.

ANDERSON, H.C., Hsu, H.H.T. (1978) A new method to measure ^{45}Ca accumulation by matrix vesicles in slices of rachitic growth plate cartilage. Metab. Bone Dis. Res. 1: 193-198.

ANDERSON, H.C. Matrix vesicle calcification: Review and update. Dans W.A. Peck (Ed): Bone and mineral research/3. Elsevier, Amsterdam. (1985) p.109-149.

ANDERSON, H.C., (1988) Mechanism of pathologic calcification Rheum. Dis. Clin. North Am. 14: 303-319

ARLET, J., ABITEBOUL, M., MAZIERES, B. (1983) Vitamine A et hyperostose vertébrale ankylosante. Rev. Rhum. 50:63-65.

- ARSENAULT, A.L., FRANKLAND, B.D., OTTENSMEYER, F.P. (1991) Vectorial sequence of mineralization in the turkey leg tendon determined by electron microscopic imaging. *Calcif. Tissue Int.* 48: 46-55.
- ASCENZI, A., BONUCCI, E. Étude comparée au microscope électronique des phases initiales de la calcification de l'os et du cartilage. Dans A.J.Hioco (Ed): *Phosphate et Metabol. Phosphocalcique*. Sandoz, Paris. (1971) p.65-77.
- BAB, I., MUHLRAD, A., SELA, J. (1979) Ultrastructural and biochemical study of extracellular matrix vesicles in normal alveolar bone of rats. *Cell Tiss. Res.* 202: 1-7.
- BALMER, F.A. et ZAUN, H. (1985) Isotretinoin therapy for progressive systemic sclerosis. *Arch. Dermatol.* 121: 308.
- BARCKHAUS, R.H., KREFTING, E.-R., ALTHOFF, J., QUINT, P., HOHLING, H.J. (1981) Electron microscopic microprobe analysis on the initial stages of mineral formation in the epiphyseal growth plate. *Cell Tiss. Res.* 217: 661-666.
- BENNET, P., VIGNERON, A.M., KAPLAN, G. (1985) Poussée évolutive d'une hyperostose vertébrale ankylosante induite par un rétinoïde. *Presse Med.* 14: 596.

- BERNARD, G.W., PEASE, D.C. (1969) An electron microscopic study of initial intramembranous osteogenesis. *Am. J. Anat.* 125: 271-290.
- BERNARD, G.W. (1972) Ultrastructural observations of initial calcification in dentine and enamel. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* 41: 1-17.
- BERNARD, G.W. (1978) Ultrastructural localization of alkaline phosphatase in initial intramembranous ossification. *Clin. Orthop.* 135: 218-225.
- BONUCCI, E. (1967) Fine structure of early cartilage calcification. *J. Ultrastruct. Res.* 20: 33-50.
- BONUCCI, E. (1970) Fine structure and histochemistry of calcifying globules in epiphyseal cartilage. *Z. Zellforsch Mikr. Anat.* 103: 192-217.
- BOYAN-SALYERS, B., VOGEL, J., RIGGAN, L., SUMMERS, F. et HOWELL, R. (1978) Application of a microbial model to biologic calcification *Metab. Bone Dis. Relat. Res.* 1: 143-147.
- BOYD, A.S. (1989) An overview of the retinoids. *Am. J. Med.* 86: 568-574.

BRAND, N.J., PETKOVICH, M., KRUST. A., CHAMBON, P., DE THÉ, H., MARCHIO, A., TIOLLAIS, P. et DEJEAN, A. (1988) Identification of a second human retinoic receptor. Nature 332: 850-853.

BRIGHTON, C.T., HUNT, R.M. (1976) Histochemical localization of calcium in growth plate mitochondria and matrix vesicles. Fed. Proc. 35: 143-147.

BRIGHTON, C.T., HUNT, R.M. (1978) Electron microscopic pyroantimonate studies of matrix vesicles and mitochondria in rachitic growth plate. Metab. Bone Dis. 1:199-213.

BURGE, S., RYAN, T. (1985) Diffuse hyperostosis associated with etretinate. Lancet 2: 397-398.

BURGESS, D.R., PRUM, B.E. (1982) Reevaluation of brush border motility: calcium induced core filament solation and microvillar vesiculation. J. Cell. Biol. 94: 97-107.

CARAFOLI, E. The uptake and release of calcium by mitochondria. Dans C.P Lees, G. Shatz, G. Dallner (Eds): Mitochondria and microsomes. Addison-Wesley Publ. Co., London. (1981) p.357-374.

CASWELL, A., GUILLAND-CUMMING, D.F., HEARN, P.R., MCGUIRE, M.K.B. (1983) Pathogenesis of chondrocalcinosis and pseudogout. Metabolism of iorganic pyrophosphate and production of calcium pyrophosphate dihydrate crystal. Ann. Rheum. Dis. 42: S27-S37.

CERIO, R., WELLS, R.S., MACDONALD, D.M. (1987) Calcifying arthropathy of the hips and diffuse hyperostosis associated with etretinate. Clin. Exp. Dermatol. 12: 129-131.

COPE, F. et WILLE, J. (1989) Retinoid réceptor antisense DNAs inhibit alkaline phosphatase induction and clonogenicity in malignant keratinocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 5590-5594.

DAILY, T.J. et NESTON, W.L. (1986) Retinoids effects on fibroblast proliferation and collagen synthesis *in vitro* and on fibrolic disease *in vivo*. J. Am. Acad. Dermatol. 15: 900-902.

DI GIOVANNA, J.J., HELFGOTT, R.K., GERBER, L.H. (1986) Extraspinal tendon and ligament calcification associated with long-term therapy with etretinate. N. Engl. J. Med. 315: 1177-1182.1

- EISENMAN, D.E., GLICK, P.L. (1972) Ultrastructure of initial crystal formation in dentin. J. Ultrastr. Mol. Struct. Res. 41: 18-28.
- ELLIS, C.N., PENNES, D.R., MARTEL, W., VOORHEES, J.S. (1985) Radiographic bone surveys after isotretinoin therapy for cystic acne. Acta. Derm. Venereol. 65: 83-85
- ENGLISH, P.B. et SEAWRIGHT, A.A. (1964). Deforming cervical spondylosis of the cat. Austral. Vet. J. 40: 376-381.
- EVANS, R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science 240: 889-895.
- FALLON, M.D., WHYTE, M.P., TEITLEBAUM, S.L. (1980) Stereospecific inhibition of alkaline phosphatase by L-tetramisole prevents in vitro cartilage calcification. Lab. Invest. 43: 489-494.
- FORESTIER, J. ROTES-QUEROL, J. (1950) Hyperostose vertébrale ankylosante sénile. Rev.Rheum. 17: 43-47.
- FORMAN, M.S. et al. (1985) Detection of antibodies to small nuclear ribonucleoproteins and small cytoplasmic ribonucleoproteins using unlabeled cell extracts. Arthritis Rheum. 28: 1356-1361.

- GAY, C.V., SCHRAER, H., HARGEST, T.E. Jr. (1978)
Ultrastructure of matrix vesicles and mineral in
unfixed embryonic bone. Metab. Bone Dis. Rel. Res.
1: 105-108
- GENGE, B.R., WU, L.N.Y., SAUER, G.R. et WUTHIER, R.E. (1988)
Role of Ca^{2+} -dependent lipid-binding proteins in matrix
vesicles. J. Bone Miner. Res. 3: S181.
- GIANNI, M., STUDER, M., CARPANI, G., TERAQ, M. et GARATTINI,
E. (1991) Retinoic acid induces liver/bone/kidney-type
alkaline phosphatase gene expression in F9 teratocarcinoma
cells Biochem. J. 274: 673-678.
- GIGUERE, V., ONG, E.S., SEGUI, P. et EVANS, R.M. (1987)
Identification of a receptor for the morphogen retinoic
acid. Nature 330: 624-629.
- GLIMCHER, M.J. (1959) Molecular biology of mineralised
tissues with particular reference to bone. Rev. Mod.
Physics 31: 359-367

- HALE, J.E., CHIN, J.E., ISHIKAWA, Y., PARADISO, P.R. et WUTHIER, R.E. (1983) Correlation between distribution of cytoskeletal proteins and release of alkaline phosphatase-rich vesicles by epiphyseal chondrocytes in primary culture. *Cell Motility* 3: 501-512.
- HANS, P., POMPOUGNAC, E., BARUCQ, J.P., BARUCQ, P., BEYLOT, C. (1988) Hyperostose vertébrale induite par l'étrétinate. *Rev. Rhum. Mal. Osteoartic.* 55: 1027-1029.
- HIROKAWA, N., TILNEY, L.G., FUGIWARA, K., HEUSER, J.E. (1982) Organisation of actin, myosin and intermediate filaments in the brush border of intestinal epithelial cells. *J. Cell. Biol.* 94: 425-443.
- HOLLANDER, D., RUBLE, P.E. (1978) Beta-carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH and flow rate effects on transport. *Am. J. Physiol.* 235: E686-E692.
- HSU, H.H.T., ANDERSON, H.C. (1977) A simple and defined method of study of calcification by isolated matrix vesicles. Effect of ATP and vesicle phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 500: 162-172
- HSU, H.H.T., ANDERSON, H.C. (1978) Calcification of isolated matrix vesicles and reconstituted vesicles from fetal bovine cartilage. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 75: 3805-3808.

HSU, H.H.T., CECIL, R.N.A., ANDERSON, H.C. (1978) The role of adenosine triphosphate, phospholipids and vesicular structure in the calcification of isolated and reconstituted matrix vesicles. *Metab. Bone Dis. Rel. Res.* 1: 169-172

HSU, H.H.T. (1983) Purification and partial characterization of ATP-pyrophosphohydrolase from bovine epiphyseal cartilage. *J. Biol. Chem.* 258: 3463-3468.

HSU, H.H.T. (1992) In vitro calcium deposition by rachitic rat matrix vesicles: nucleoside triphosphate supported calcium deposition. *Biochim. Biophys. Acta* 1116: 227-233.

HUNTZIKER, E.B., HERMANN, R.K., SCHENK, R.K. Structural integration of matrix vesicles in calcifying cartilage after cryofixation and freeze-substitution. Dans A. Ascenzi, E. Bonucci, B. de Bernard (Eds): *Proceedings of the Third International Conference on Matrix Vesicles.* Wichtig Editore, Milano. (1981) p. 25-32.

BROCKES, J. (1991) We may not have a morphogen. *Nature* 350 : 15

- KANABE, S., HSU, H.H.T., CECIL, R.N.A. (1983)
Electron microscopic localisation of adenosine triphosphate (ATP)-hydrolysing activity in isolated matrix vesicles and reconstituted vesicles from calf cartilage. *J. Histochem. Cytochem* 31: 462-470.
- KRUST, A., KASTNER, P., PETKOVICH, M., ZELENT, A. et CHAMBON, P. (1989) A third human retinoic acid receptor RAR- γ . *Prod. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5310-5314.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* 227: 680-685.
- LAGIER, R. (1979) L'hyperostose vertébrale en pathologie comparée. *Rev. Rhum. Mal. Osteoartic.* 46: 467-473.
- LEID, M., KASTNER, P., LYONS, R., NAKSHATRI, H., SAUNDERS, M., ZACHAREWSKI, T., CHEN, J-Y., STAUB, A., GARNIER, J-M., MADER, S. et CHAMBON, P. (1992) Purification, cloning and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to binds target sequences efficiently. *Cell* 68: 377-395.
- LOWRY, O.H., ROBERTS, N.R., WU, M.L., HIXON, W.S., CRAWFORD, E.J. (1954) The quantitative histochemistry of brain II: Enzyme measurements. *J. Biol.* 207: 19-26.

LUSSIER, A., MADARNAS, P., LALIBERTÉ, L., DE MEDICIS, R.
(1989) "Vertebral hyperostosis induced by vitamin A in the
rat. Arthritis. Rheum. 32 no 1(suppl.): B34N.

LUSSIER, A., MADARNAS, P., LALIBERTÉ, L., GUITÉ, C., BROWN,
J., DE MEDICIS, R. (1989) "DISH Induced by vitamin A in
the rat" Arthritis. Rheum. 32 no 5(suppl.): C125,S112.

MAJESKA, R.J., HOLVERDA, D.L. et WUTHIER, R.E. (1979)
Localization of phosphatidylserine in isolated chick
epiphyseal cartilage matrix vesicles with tritrobenzene
sulfonate. Calcif. Tissus Int. 27: 41-46.

MANGELSDORF, D.J. et EVANS, R.M. Vitamin A receptors: new
insights on retinoic control of transcription. Dans G.
Morriss-Kay (ED): Retinoids in normal development and
teratogenesis. Oxford University Press, Oxford (1992)
pp.27-50.

MANGELSDORF, D.J., ONG, E.S., DYCK, J.A. et EVANS, R.M.
(1990) Nuclear receptor that identifies a novel retinoic
acid response pathway. Nature 345: 224-229.

MARTIN, A., LONE, P., FROCRAIN, L., CHALER, G., MAEDES, J.,
LEMAITRE, R., PAWLANSKY, Y. (1989) Une nouvelle
observation de la maladie hyperostotique induite par un
rétinoïde. Rev du Rhum. 56: 687-690.

- MATSUZAWA, T. et ANDERSON, H.C. (1971) Phosphatases of ephiphyseal cartilage studied by electron microscopic cytochemical methods. *J. Histochem. Cytochem.* 19: 801-808.
- MELNICK, B., GLUCK, S. (1987) Retrospective radiographic study of skeletal changes after long-term etretinate therapy. *Br. J. Dermatol.* 116: 207-212.
- MERRIMAN, R.L. et BERTRAM, J.S. (1979) Reversible inhibition by retinoids of 3-methylcholanthrene induce neoplastic transformation in CH3/10T1/2 clone 8 cells. *Cancer Res.* 39: 1661-1666
- MORRIS, D.C., VAANANEN, H.K., MUNOZ, P. Light and electron microscopic immunolocalization of alkaline phosphatase in bovine growth plate cartilage. Dans S.Y. Ali (Ed): *Cell mediated calcification and matrix vesicles.* Elsevier Sci. Publ, Amsterdam. (1986) p. 21-26
- MOSS, D.W. (1986) Multiple forms of acid and alkaline phosphatases: genetics, expression and tissue-specific modification. *Clin. Chim. Acta* 161: 123-135.
- MUHLRAD, A., BAB, I.A., DEUTSCH, D., et SELA, J. (1982) Occurrence of actin-like protein in extracellular matrix vesicles. *Calcif. Tissue Int.* 34: 376-381.

MURPHREE, S, HSU, H.H.T., ANDERSON, H.C. (1982) The in vitro formation of crystalline apatite by matrix vesicle isolated rachitic rat epiphyseal cartilage. *Calcif. Tiss. Internat.* 34: 562-568

MUTO, K. OHYAMA, K. AOKI, Y. TAMURA, K. OHSUGI, K. IDE, H. TANIGUCHI, S. SAITO, T. (1991) Retinoic acid induces polarizing activity but is unlikely to be a morphogen in the chick limb bud. *Nature* 350: 83-86.

NAKAYAMA, Y., TAKAHASHI, K., NOJI, S., MUTO, K., JISHIJIMA, K. et TANIGUCHI, S. (1990) Functional modes of retinoic acid in mouse osteoblastic clone MC3T3-E1, proved as a target for retinoic acid. *FEBS Lett.* 261: 93-96.

NG, K., GUMMER, P., MICHELANGELI, V., BATERMAN, J., MASCARA, T., COLE, W., MARTIN, T. (1988) Regulation of alkaline phosphatase expression in a neonatal rat clonal calvarial cell strain by retinoic acid. *J. Bone Miner. Res.* 3: 53-61.

NG, K., HUDSON, P., POWER, B., MANJI, S., GUMMER, P., MARTIN, T. (1989) Retinoic acid and tumor necrosis factor- α act in concert to control the level of alkaline phosphatase mRNA. J.Mol. Endocrinol. 3: 57-64

OBERG, K.C., SODERQUIST, A.M., CARPENTER, G. (1988) Accumulation of epidermal growth factor receptors in retinoic acid-treated fetal rat lung cells is due to enhanced receptor synthesis. Mol. Endocrinol. 2: 959-965.

OZAWA, H., NAJIMA, T. Ultrastructure and cytochemistry of matrix vesicles in developing cartilage and tooth germ. Dans T. Takeuchi, K. Ogawa, S.Fujita (Eds): Fourth International Congress on Histochemistry and Cytochemistry. Kyoto (1972) p. 311-312.

OZAWA, H., YAMAMOTO, T. (1983) An application of energy-dispersive x-ray microanalysis for the study of biological calcification. J. Histochem. Cytochem. 31: 210-213.

PAPASAVAS, G.K., BHALLA, A.K., LOGAN, R.A. (1987) Vertebral hyperostosis associated with etretinate therapy. Clin. Exp. Dermatol. 12: 202-203.

- PENNES, D.R., ELLIS, C.N., MADISON, K.C., VOORHEES, J.J., MARTEL, W. (1984) Early skeletal hyperostosis secondary to 13-cis retinoic acid. AJR AM. J.Roentgenol. 142: 979-983.
- PENNES, D.R., MARTEL, W., ELLIS, C., VOORHEES, J.J. (1988) Evolution of skeletal hyperostosis caused by 13-cis retinoic acid therapy. AJR AM. J.Roentgenol. 151: 967-73.
- PENNISTON, J.T., GRAFT, E., NIGGLI, V., VERMA, A.K., CARAFOLI, E. (1980) The plasma membrane calcium ATPase. Develop. Biochem. 14: 23-30.
- PERIQUET, B., LAMBERT, W., GARCIA, J., LECOMTE, G., De LEENHEER, A.P., MAZIERES, B., THOUVENOT, J.P. et ARLET, J. (1991) Increased concentrations of endogenous 13-cis and all-trans retinoic acids in diffuse idiopathic skeletal hyperostosis as demonstrated by HPLC. Clin. Chim. Acta 203 (1): 57-65.
- PERRON, J.-F., DE MÉDICIS, R., SIROIS, P., LUSSIER, A. (1991) Influence of retinoic acid on the pyrophosphatase activity of fibroblasts in culture. Arthritis. Rheum. 34 no 9(suppl.): C80.

- PERRON, J.-F., DE MÉDICIS, R., SIROIS, P., LUSSIER, A.
(1992) Influence de l'acide rétinoïque sur la phosphatase alcaline et la pyrophosphatase des fibroblastes. Med. Sci. 8: no 2.
- PERRON, J.-F., DE MÉDICIS, R., SIROIS, P., LUSSIER, A.
(1992) Retinoic acid increases alkaline phosphatase in cultured fibroblasts and in extracellular vesicles. (1992) 35 no9(suppl.): D14.
- PETKOVICH, M., BRAND, N.J., KRUST, A., CHAMBON, P. (1987a)
A human retinoic receptor which belongs to the family of nuclear receptors. Nature 330: 444-450.
- PETKOVICH, P.M., HEERSCHE, J.N.M., AUBIN, J.E., GRIGORIADIS, A.E. et JONES, G. (1987b) Retinoic acid induced changes in 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor levels in tumor and nontumor cells derived from rat bone. J. Natl. Cancer Inst. 78:265-270.
- PITTSLEY, R.A., YODER, F.N. (1983) Retinoid hyperostosis: skeletal toxicity associated with long term administration of 13-cis retinoic acid for refractory ichthyosis. N. Engl. J. Med. 308: 1012-1014.

- REESE, D.H., LARSEN, R.A. et HORNICEK, F.J. (1992) Control of alkaline phosphatase activity in C3H10T1/2 cells: Role of retinoic acid and cell density. *J. Cell Physiol.* 151: 239-248.
- REESE, D., POLITANO, V. (1981) Evidence for the retinoid control of urothelial alkaline phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102: 322-327
- REGISTER, T.C., McLEAN, F.M., LOW, M.G. et WUTHIER, R.E. (1986) Roles of alkaline phosphatase and labile internal mineral in matrix vesicle-mediated calcification. *J. Biol. Chem.* 261: 9354-9360.
- RODAN, S., WESOLOWSKI, G., HILTON, D., NICOLA, N., RODAN, G. (1990) Leukemia inhibitory factor binds with high affinity to preosteoblastic RTC-1 cells and potentiates the retinoic acid induction of alkaline phosphatase. *Endocrinology* 127: 1602-1608
- ROWE, A., EAGER, N.S.C., RICHMAN, J. et BRICKELL, P.M. retinoic acid receptors in the chick embryo. Dans G. Morriss-Kay (ED): *Retinoids in normal development and teratogenesis.* Oxford University Press, Oxford (1992) pp.85-98.

- RYAN, L.M., WORTMANN, R.L., KARAS, B., LYNCH, M.P. et McCARTY, D.J. (1986) Pyrophosphohydrolase activity and inorganic pyrophosphatase content of cultured human skin fibroblasts. J. Clin. Invest. 77: 1689-1693.
- SATO, N., ASANO, S., URABE, A., OHSAWA, N. et TAKAKU, F. (1985) Induction of alkaline phosphatase in neutrophilic granulocytes, a marker of cell maturity, from bone marrow of normal individuals by retinoic acid. Biochem. Biophys. Res. Commun. 131: 1181-1186
- SEAWRIGHT, A., ENGLISH, P. et GARDNER, R. (1967) Hypervitaminosis A and deforming cervical spondylosis of the cat. J. Comp. Pathol. 77: 29-39.
- SHAPIRO, I.M., LEE, N.H. (1975) Effect of Ca^{2+} on the respiratory activity of chondrocyte mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 170: 627-633.
- SIDELL, N., RAMSDELL, F. (1988) Retinoic acid upregulates interleukin-2 receptors on activated human thymocytes. Cell. Immunol. 115: 299-309.
- SILLEVIS-SMITH, J.H., DE MARI, F.R. (1984) A serious side effect of etretinate. Clin. exp. dermatol. 9: 554-556

- SISCA, R.F., PROVENZA, D.V. (1972) Initial dentin formation in human deciduous teeth. An electron microscope study. *Calc. Tissue. Res.* 9: 1-16.
- SIVAPRASADARAO, A., FINDLAY, J.B.C. (1988a) The interaction of retinol-binding protein with its plasma membrane receptor. *Biochem. J.* 255: 561-569.
- SIVAPRASADARAO, A., FINDLAY, J.B.C. (1988b) The mechanism of uptake of retinol by plasma-membrane vesicles. *Biochem. J.* 255: 571-579.
- SLACK, J.M.W. (1987) We have a morphogen. *Nature* 327: 553-554.
- SLAVKIN, H.C., BRINGAS, P.Jr. CROISSANT, R. (1972) Epithelial-mesenchymal interactions during odontogenesis. II. Interaction intercellular matrix vesicle. *Mech. Ageing Dev.* 1: 139-161.
- SPORN, M., ROBERTS, A. et GOODMAN, D. The retinoids, Academic Press, Orlando, (1984) vol. 1-2.
- TAKANO, Y., OZAWA, H. et CRENSHAW, M.A. (1986) Ca-ATPase and ALPase activities at the initial calcification sites of dentin and enamel in rat incisor. *Cell Tiss. Res.* 243: 91-99.

- TERMINE, J.D. Chemical characterization of fetal bone matrix constituents. Dans A. Veis (Ed): The chemistry and biology of mineralised connective tissue. Elsevier/North-Holland, New York (1981) p. 349.
- THALLER, C. et EICHELE, G. (1987) Identification and spatial distribution of retinoids in the developing limb bud Nature 327: 625-628.
- THOMPSON, K.L. et ROSNER, M.R. (1989) Regulation of epidermal growth factor receptor gene expression by retinoic acid and epidermal growth factor. J. Biol. Chem. 264: 3230-3234.
- WANEK, N. GARDINER, D.M. MONEOKA, K. BRYANT, S.V. (1991) Conversion by retinoic acid of anterior cells into ZPA cells in the chick wing bud. Nature 350: 81-83.
- WUTHIER, R.E. (1975) Lipid composition of isolated epiphyseal cartilage cells, membranes and matrix vesicles. Biochim. Biophys. Acta 409: 128-143.
- WUTHIER, R.E., GORE, S.T. (1977) Partition of inorganic ions and phospholipids in isolated cell, membrane, and matrix vesicle fractions: Evidence for Ca-Pi-acidic phospholipid complexes. Calcif. Tissue Res. 24: 163-171.

- WUTHIE, R.E. (1977) Electrolytes of isolated epiphyseal chondrocytes, matrix vesicles and extracellular fluid. *Calcif. Tissue Res.* 23: 125-133.
- WUTHIER, R.E., LINDER, R.E., WARNER, G.P., GORE, S.T et BORG, T.K. (1978) Non-enzymatic isolation of matrix vesicles: Characterization and initial studies on ^{45}Ca and ^{32}P -orthophosphate metabolism. *Metab. Bone Dis. Relat. Res.* 1: 125-136.
- WUTHIER, R.E. (1988) Mechanism of matrix vesicle-mediated mineralization of cartilage. *ISI Atlas of Science: Biochemistry* 231-241.
- YU, V.C., DELSERT, C., ANDERSEN, B., HOLLOWAY, J.M., DEVARY, O.V., NAAR, A.M., KIM, S.Y., BOUTIN, J-M., GLASS, C.K. et ROSENFELD, M.G. (1991) RXR β : a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* 67: 1251-1266.

REMERCIEMENTS

Je désire exprimer ma profonde reconnaissance envers mes co-directeurs de mémoire, le Dr Pierre Sirois et le Dr André Lussier qui m'ont permis de compléter mes études de recherche en maîtrise. Aussi, je remercie chaleureusement le Dr Rinaldo de Médicis pour son soutien et ses conseils de grande valeur durant mes recherches et durant l'élaboration de ce document.

Je remercie chaleureusement le directeur du service de rhumatologie, le Dr Henri Ménard qui m'a accueilli dans son équipe.

Je veux souligner particulièrement la contribution de Ginette Girard et de Lucie Laliberté durant la réalisation de ce projet de recherche.

Je remercie également les docteurs Normand Brière, Gaétan Guillemette, Pierre Sirois, André Lussier et Rinaldo de Médicis qui ont permis, par leur suggestions et leurs corrections, que ce travail soit lisible et plus compréhensible.

Des remerciements additionnels vont à Nathalie Monast ainsi qu'aux secrétaires Alice Chapdelaine et Marthe Filion pour leur précieuse aide technique et leur appui lors de la mise en page de ce mémoire.

Je garderai un excellent souvenir de tous les autres membres du département qui m'ont soutenu moralement tout au long de ma maîtrise.

LISTE DES PRODUITS

Acétate de sodium:	J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, New Jersey
Acétone:	Anachemia, Montréal
Acide acétique:	BDH Chemicals Limited, Toronto
Acide cacodylique:	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
Acide chlorydrique (HCl):	Anachemia, Montréal
Acide nitrique:	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
Acide rétinoïque (tout-trans):	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri
Acide sulfurique (H ₂ SO ₄):	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
Acrylamide:	Bio-Rad Laboratories, Richmond, Californie
ADN de thymus de veau:	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri
Anti-IgG de souris biotinylés:	Jackson Immuno Research Laboratories, Toronto
Anti-phosphatase alcaline de veau (souris):	Jackson Immuno Research Laboratories, Toronto
ATP:	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri

Bicarbonate de sodium (NaHCO_3):	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
Bis-acrylamide:	Bio-Rad Laboratories, Richmond, Californie
Bleu de bromophénol:	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
BSA:	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri
Carbonate de sodium:	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
Chlorure de calcium (CaCl_2):	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
Chlorure de magnésium (MgCl_2):	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
Chlorure de potassium (KCl):	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
Chlorure de sodium (NaCl):	BDH Chemical Limited, Toronto
CLAP:	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri
CO_2 :	Liquid Carbonic Company, Scarborough, Ontario
Collagénase type P:	Boehringer Mannheim Bio- chemicals, Dorval, Québec
DEAE (DE-52):	Whatman Bio Systems Ltd, Angleterre

Dichromate de potassium:	Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wisconsin
Diéthanolamine-HCl:	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri
DMEM:	Gibco Laboratories, Burlington, Ontario
DMF:	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
DMSO:	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
EDTA (sel sodique):	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
EGTA:	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri
EPON	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
Éthanol:	Les alcools de Commerce Inc. Brampton, Ontario
Fast Blue BB:	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri
Fongizone:	Gibco Laboratories, Burlington, Ontario
Formaldéhyde:	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
Gentamycine:	Gibco Laboratories, Burlington, Ontario

Glutaraldéhyde:	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
Glycérol:	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
Glycine:	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri
HBSS:	Gibco Laboratories, Burlington, Ontario
Hoechst (bisbenzimide):	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri
Hydroxide de sodium (NaOH):	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
Molybdate d'ammonium:	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
Naphtol-As-Mx-Phosphate:	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri
Nitrate d'argent:	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
Nonidet P-40 (NP-40):	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri
OPD:	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri
Orthophosphate disodique de nitro-4 phényle	Sigma Chemical Company
P-nitrophénol:	Sigma Chemical Company St-Louis, Missouri

	St-Louis, Missouri
PCA:	Fisher Scientific Company, St-Louis, Missouri
Persulfate d'ammonium:	Bio-Rad Laboratories, Richmond, Californie
Phosphate de potassium:	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
Phosphate de sodium (Na_2HPO_4):	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
PMSF:	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri
PPi:	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
[^{32}P]PPi:	NEN_Products, Boston, Massachusetts
Pyronine:	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri
SDS:	Fisher Scientific Company, Fair Lawn, New Jersey
Séphadex G-75:	Pharmacia, Uppsala, Suisse
Sépharose CN-Br:	Pharmacia, Uppsala, Suisse
Sérum de veau foetal (FBS):	Flow Laboratories, Mississauga, Ontario
Standards de poids molé- culaire pour la filtra- tion sur gel:	Pharmacia, Uppsala, Suisse

Streptavidine-peroxidase:	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri
β -Mercaptoéthanol:	Calbiochem, San Diego, Californie
TEMED:	Bio-Rad Laboratories, Richmond, Californie
Tétroxyde d'osmium:	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri
Triéthylamine-HCl:	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri
Tris-Base:	Boehringer Mannheim Bio- chemicals, Dorval, Québec
Trypsin:	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri
TTR:	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri
Tween-20 (T-20):	Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri